



**Ana Carolina Correia da Silva Pádua**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Projecto de um bio-reactor para cultura celular em membranas tubulares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Jorge Carvalho Silva, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Pereira

Arguente: Prof. Doutor Hugo Alexandre Ferreira

Vogal: Prof. Doutor José Luís Ferreira



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Dezembro de 2014



LOMBADA

2014

Projecto de um bio-reactor para cultura celular em membranas tubulares  
Ana Pádua





**Ana Carolina Correia da Silva Pádua**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Projecto de um bio-reactor para cultura celular em membranas tubulares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: José Luís Constantino Ferreira, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Jorge Carvalho Silva, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

### Constituição do júri

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Prof. Doutor Hugo Alexandre Teixeira Duarte Ferreira, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Vogal: Prof. Doutor José Luís Constantino Ferreira, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Dezembro de 2014**



## **Projecto de um bio-reactor para cultura celular em membranas tubulares**

Copyright © 2014. Todos os direitos reservados. Ana Carolina Pádua, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





## *Agradecimentos*

---

A realização deste projecto foi possível graças a pessoas que me apoiaram, incentivaram e auxiliaram incondicionalmente. Através destas simples palavras, quero aqui expressar o meu enorme agradecimento.

Começo por destacar o meu orientador, o professor José Luís Ferreira, pela incansável disponibilidade e pelo auxílio em todos os momentos. Considero-o um mentor que me instruiu com críticas construtivas, esteve sempre atento ao trabalho desenvolvido e nunca me deixou perder o foco nos aspectos mais importantes. Saliento também a preciosa ajuda do meu co-orientador, o professor Jorge Silva, pela sua disponibilidade, imensa dedicação e entusiasmo. Sinto-me privilegiada por ter trabalhado com dois professores que, com os seus sábios conselhos, comentários e sugestões contribuíram para levar este projecto a bom-porto.

Também quero expressar o meu agradecimento ao professor Paulo Ribeiro por me ter acolhido no seu laboratório e disponibilizado material imprescindível para o desenvolvimento deste projecto. E ao meu colega de laboratório, Jorge Ribeiro, pela ajuda na edição de imagens.

Agradeço ainda ao Engenheiro João Faustino, pelo apoio que me prestou na construção da câmara de cultura e na concepção da placa de circuito impresso; e ao investigador Gabriel Martins do IGC, por ter concedido as células endoteliais utilizadas no projecto. Estou grata também ao Sr. Eduardo Joblin e ao Sr. José Mesquita pelo auxílio prestado e boa vontade sempre demonstrada.

Destaco a ajuda do meu amigo Alexandre Costa, por me ter transmitido os conhecimentos essenciais para trabalhar em *SolidWorks*, e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Muito obrigada aos meus colegas e melhores amigos de Engenharia Biomédica, pelo companheirismo e entreaajuda ao longo da minha vida académica, nomeadamente Ricardo Eleutério, Pedro Ferreira, Guilherme Coutinho, Margarida Félix, Rafael Simões, Vanessa Cunha e Catarina Cavaco. Agradeço ainda aos meus amigos de Santo André, Pedro Correia e Bruno Pacheco. E ao meu namorado, Gonçalo Mestre, por todo o apoio.

Finalmente, e porque eles são a base de tudo, um eterno obrigada aos meus pais, que sempre me incentivaram com força e confiança, à minha inseparável irmã, aos meus avós, pelo imenso carinho, à minha madrinha, pela coragem, e aos meus tios e primas, pelo humor e união.

A todos, muito obrigada!



O Grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL desenvolve e produz membranas poliméricas tubulares biodegradáveis que servem de substrato a culturas celulares e que se destinam a substituir temporariamente vasos sanguíneos danificados.

O objectivo desta dissertação foi o desenvolvimento de um bio-reactor com a capacidade de bombeamento controlado de um fluido adequado à manutenção de uma cultura celular, que simula a passagem do fluxo sanguíneo pelo interior das membranas tubulares, permitindo que as células nelas semeadas recebam os estímulos adequados ao seu desenvolvimento.

Foi construído um bio-reactor de perfusão pulsátil para cultura celular em membranas tubulares que é instalável numa incubadora, beneficiando assim de condições ambientais — pH, temperatura e humidade — semelhantes às fisiológicas. O bio-reactor é capaz de gerar estímulos mecânicos pulsáteis favoráveis ao alinhamento de células endoteliais e de músculo liso. O sistema foi desenvolvido de modo a que a pressão e o caudal aplicados às membranas pudessem ser monitorizados e controlados.

Foram semeadas células endoteliais em matrizes planas de policaprolactona, tendo-se confirmado a sua adesão e proliferação por microscopia de fluorescência. Após enrolamento, obtiveram-se duas membranas tubulares com células endoteliais semeadas no lúmen. Uma delas foi submetida a cultura estática, e outra a cultura dinâmica no bio-reactor.

Após 10 dias de condicionamento *in vitro*, as membranas foram novamente observadas por microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos não foram conclusivos, pelo que serão necessários novos estudos para concluir se o bio-reactor construído é capaz de garantir o condicionamento mecânico das células semeadas nas matrizes.

Palavras-chave: Bio-reactor, Membranas tubulares, Enxertos vasculares, Células endoteliais, Engenharia de Tecidos.



The Tissue Engineering Research Group of FCT/UNL develops and produces tubular biodegradable polymeric scaffolds. These scaffolds are used for cell culture and their finality is to temporarily replace damaged blood vessels.

The aim of this dissertation was the development of a bioreactor with controlled pumping capacity of cell culture medium and thereby simulates the blood flow through the scaffolds, allowing the seeded cells to receive the adequate stimuli to their development.

A pulsatile perfusion-based bioreactor was designed and built for cell culture in scaffolds. Due to the fact that it was installed inside an incubator, certain environmental parameters — pH, temperature and humidity — were kept at similar levels to the physiological ones. The bioreactor has a pump system that generates mechanical stimuli, which benefit the alignment of the endothelial cells and smooth muscle cells. This system was also designed to monitor and control the pressure and the flow applied to the scaffolds.

Endothelial cells were seeded in planar matrices of polycaprolactone. Their adhesion and proliferation was confirmed by fluorescence microscopy. After the wrapping process, two scaffolds with seeded cells in the lumen were obtained. One of them was exposed to static culture, and the other to dynamic culture in the bioreactor.

After 10 days of *in vitro* incubation, the scaffolds were again observed by Fluorescence Microscopy. From the obtained results, it wasn't possible to determine if the bioreactor is able to apply the mechanical conditioning to the cells seeded in the scaffolds, therefore, additional studies are required.

Keywords: Bioreactor, Scaffolds, Vascular grafts, Endothelial cells, Tissue Engineering.



Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Lista de figuras .....	ix
Lista de tabelas .....	xiii
Siglas e acrónimos.....	xv
1. Introdução .....	1
1.1. Membranas tubulares e bio-reactores .....	1
1.2. Objectivos .....	2
1.3. Estrutura do documento.....	2
2. Substitutos de vasos sanguíneos .....	3
2.1. Doenças cardiovasculares.....	3
2.2. Enxertos vasculares.....	5
2.2.1. Enxertos autólogos .....	5
2.2.2. Enxertos sintéticos.....	5
2.2.3. Enxertos de Engenharia de Células e Tecidos.....	5
2.2.3.1 Enxertos com matrizes de materiais não biológicos .....	6
2.2.3.2 Enxertos com matrizes de materiais biológicos .....	7
2.2.3.3 Enxertos vasculares sem matrizes.....	8
2.3. Cultura celular em enxertos .....	8
3. Bio-reactores para culturas celulares .....	11
3.1. Bio-reactores de perfusão pulsátil .....	11
3.2. Principais características de bio-reactores .....	16
3.2.1. Câmara de cultura .....	16
3.2.2. Sensores de pressão .....	17
3.2.3. Sensor de caudal .....	17
3.2.4. Sistema de aquecimento e controlo de temperatura .....	17
3.2.5. Sistema de controlo de gases.....	18
3.2.6. Sistema de bombeamento pulsado .....	18
3.2.7. Meio de cultura.....	19
3.2.8. Esterilização.....	20
3.2.9. Período de incubação .....	20
4. Desenvolvimento do bio-reactor .....	21

4.1. Componentes do bio-reactor .....	23
4.1.1. Câmara de cultura .....	23
4.1.2. Reservatório de meio de cultura .....	26
4.1.3. Bomba peristáltica .....	27
4.1.4. Tubos e acessórios .....	28
4.1.5. Sensores de pressão .....	28
4.1.5.1 Amplificação do sinal de pressão .....	30
4.1.5.2 Calibração das medidas de pressão .....	33
4.1.6. Sensor de caudal .....	34
4.1.7. Programação do microcontrolador.....	35
4.1.8. Programa de aquisição de dados .....	36
4.2. Ligação do bio-reactor à incubadora .....	39
4.3. Ensaio de citotoxicidade aos materiais do bio-reactor .....	39
4.4. Testes do sistema de monitorização da pressão .....	42
4.5. Testes ao bio-reactor .....	43
5. Cultura celular no bio-reactor.....	45
5.1. Produção de matrizes .....	45
5.2. Cultura celular preliminar em matrizes planas.....	47
5.3. Cultura estática e cultura dinâmica.....	49
5.4. Observação e comparação das culturas celulares.....	51
6. Conclusão .....	53
Bibliografia.....	55
Apêndice A — Parâmetros de funcionamento de vários bio-reactores .....	A-1
Apêndice B — Desenhos técnicos .....	B-1
Apêndice C — Protocolo para limpeza e esterilização do bio-reactor .....	C-1
Apêndice D — Protocolo para montagem do bio-reactor .....	D-1
Apêndice E — Protocolo para colheita de células a semear .....	E-1
Apêndice F — Protocolo para sementeira de células em matrizes planas .....	F-1
Apêndice G — Preparação do bio-reactor para incubação.....	G-1



## *Lista de figuras*

Figura 2.1	Percentagem de óbitos pelas principais causas de morte no total das causas de morte em Portugal (1988-2011). [2] .....	3
Figura 2.2	Acidentes vasculares. A) Desenvolvimento de acidente vascular cerebral (adaptado de [3]). B) Desenvolvimento de enfarte agudo do miocárdio (adaptado de [4]).....	4
Figura 2.3	Esquema ilustrativo de abordagens usadas em engenharia de tecidos para produção e aplicação clínica de substitutos de vasos sanguíneos. (adaptado de: [9]).....	6
Figura 2.4	Matriz de nanofibras de policaprolactona e quitosano (dois polímeros naturais e biodegradáveis) para suporte de cultura celular.....	7
Figura 3.1	Bio-reactor de perfusão pulsátil. (A) (esquerda) Esquema do sistema, que inclui (1) uma ou mais bombas pulsáteis, (2) uma câmara de cultura, (3) um reservatório de meio, (4) uma bomba peristáltica, (5) uma câmara de amortecimento, (6) válvulas anti-retorno; (direita) Fotografia do sistema de bio-reactor. (B) Fotografia da câmara de cultura. (C) Representação de formas de onda de pressão geradas usando o bio-reactor definido para simular condições pulsáteis fetais (esquerda) ou adultas (direita). [28].....	12
Figura 3.2	Esquema de bio-reactor pulsátil baseado em hemodinâmica desenvolvido por Iwasaki <i>et al.</i> [29].....	13
Figura 3.3	Bio-reactor de perfusão pulsátil para cultura celular de alta densidade em 3D de Chouinard <i>et al.</i> (1) sistema pulsador, (2) câmara de amortecimento, (3) medidor de fluxo mássico, (4) unidade de aquecimento, (5) unidade de renovação de gás, (6) câmara de cultura celular. [30] .....	13
Figura 3.4	Esquema simbólico de funcionamento do bio-reactor de cultura pulsátil criado por Wang <i>et al.</i> [23].....	14
Figura 3.5	Esquema de um bio-reactor de perfusão desenvolvido por Song <i>et al.</i> (1) entrada de ar, (2) saída de ar, (3) entrada de fluido, (4) saída de fluido, (5) renovador gás/líquido e líquido/líquido, (6) tubo de silicone, (7) bomba com motor, (8) câmara de cultura, (9) enxerto de engenharia de tecidos, (10) sensor de pressão. [31] .....	15
Figura 3.6	Esquema do bio-reactor de Cho Mun <i>et al.</i> (1) bomba peristáltica com opção de duas cabeças de bomba, (2) válvula doseadora, (3) câmara de cultura e (4) tubagem. [22].....	15

Figura 3.7	Esquema do bio-reactor de perfusão pulsátil de Diamantouros <i>et al.</i> . (A) Reservatório de meio de cultura, (B) Bomba de circulação, (C) Grampo de tubo, (D) Sensor de fluxo, (E) Sensor de pressão, (F) Câmara de cultura, (G) Micrómetro óptico, (H) Gerador de pulso e (I) Sensores de oxigénio, dióxido de carbono e pH. [32].....	16
Figura 4.1	Esquema do bio-reactor. SC – Sensor de Caudal; SP1 – Sensor de Pressão 1; SP2 – Sensor de Pressão 2; PCB – Placa de Circuito Impresso ( <i>Printed Circuit Board</i> ). .....	22
Figura 4.2	Câmara de cultura celular. A) Estrutura; B) Tampa. ....	25
Figura 4.3	Ligadores inseridos na câmara de cultura. No lado esquerdo os ligadores externo e interno encontram-se ainda não unidos. No lado direito pode observar-se o encaixe entre estes.....	26
Figura 4.4	Tampa do reservatório de meio de cultura adaptada para permitir a entrada e saída de meio de cultura e ocorrências de trocas gasosas com a atmosfera da incubadora através de um filtro. ....	27
Figura 4.5	Bomba peristáltica usada para bombear o meio de cultura pelo interior das membranas tubulares. ....	27
Figura 4.6	A) Sensor de pressão diferencial; B) Esquema interno do sensor e dos seus terminais. ....	29
Figura 4.7	A) Desenho de identificação dos terminais do sensor de pressão; B) Fotografia que mostra a correcta inserção dos sensores de pressão no cabo. ....	30
Figura 4.8	Esquema do circuito da placa de circuito impresso implementado em <i>software</i> Eagle. ....	31
Figura 4.9	Placa de circuito impresso do bio-reactor. A) Desenho e esquema de montagem dos componentes à escala 1:1; B) Imagem da placa com os componentes já soldados. ....	32
Figura 4.10	Recta de calibração do sensor de pressão posicionado à entrada da câmara de cultura. ....	33
Figura 4.11	Recta de calibração do sensor de pressão posicionado à saída da câmara de cultura. ....	33
Figura 4.12	Painel Frontal do LabVIEW, em modo de apresentação dos gráficos de pressão (em mmHg) à entrada da câmara de cultura (linha vermelha), à saída da câmara de cultura (linha azul) e da média entre as pressões à entrada e à saída da câmara de cultura (linha verde) em função do tempo de aquisição (em hh:mm:ss). Os canais seleccionados foram “Pressão”, “Entrada” e “Saída”. ....	38

Figura 4.13	Tampa da incubadora. A – Cabo de seis condutores; B – Tubos com diâmetro externo de 6 mm. ....	39
Figura 4.14	Ilustração da placa de 48 poços, utilizada no ensaio de citotoxicidade. A) Imediatamente após a adição de meio de cultura com 10 % de resazurina a cada um dos poços da placa; B) Após quatro horas de incubação com resazurina. C+: Controlo Positivo; C-: Controlo Negativo; CM: Controlo de Meio. ....	41
Figura 4.15	Gráfico de pressão à entrada da câmara de cultura (mmHg) em função do tempo (hh:mm:ss), com a bomba peristáltica em funcionamento e por ajuste de uma válvula. Tensão de alimentação da bomba: 3 V.....	42
Figura 4.16	Gráfico de pressão à saída da câmara de cultura (mmHg) em função do tempo (hh:mm:ss), com a bomba peristáltica em funcionamento e por ajuste de uma válvula. Tensão de alimentação da bomba: 3 V.....	42
Figura 5.1	Equipamento de electrofiação. 1 – Fonte de alimentação; 2 - Bomba de seringa; 3 – Colector rotativo. ....	46
Figura 5.2	A) Matriz de PCL resultante de electrofiação usando-se os parâmetros da Tabela 5-1; B) Fracções de matrizes cortadas em quadrados de 49 mm x 49 mm. ....	46
Figura 5.3	Fotografia das máscaras de Teflon (brancas) e das caixas de Petri com as matrizes de PCL no seu interior. Na tampa de cada caixa de Petri está marcada a zona de sementeira de células. ....	48
Figura 5.4	Fotografias obtidas por microscopia de fluorescência e que mostram as células endoteliais semeadas nas matrizes de PCL três dias após o início da sementeira. A) Matriz 1 – que foi posteriormente submetida a cultura estática; B) Matriz 2 – que foi posteriormente submetida a cultura dinâmica no bio-reactor. ....	49
Figura 5.5	Condicionamento das membranas tubulares em condições de: A) Cultura estática numa caixa de Petri; B) Cultura dinâmica no bio-reactor. ....	49
Figura 5.6	Montagem do bio-reactor na incubadora com a membrana tubular instalada na câmara de cultura. ....	50



## *Lista de tabelas*

---

Tabela 3-1	Parâmetros (pH e dissolução de O <sub>2</sub> ) ajustados em sistemas de controlo de gases de bio-reactores. ....	18
Tabela 3-2	Pressões e caudais aplicados em cada fase do período de cultura no bio-reactor de Cho Mun <i>et al.</i> : aumento gradual.....	19
Tabela 4-1	Especificações técnicas da bomba peristáltica. [40] .....	27
Tabela 4-2	Características técnicas dos sensores de pressão. ....	28
Tabela 4-3	Correspondência entre os terminais de ambos os sensores de pressão e os fios dos cabos de cor preta e de cor branca. ....	29
Tabela 4-4	Correspondência entre os sinais e os fios do cabo de cor cinzenta. ....	29
Tabela 4-5	Características técnicas do amplificador de instrumentação INA 114AP. ....	31
Tabela 4-6	Caudal (mL/min) em função da tensão de alimentação eléctrica da bomba. ....	34
Tabela 4-7	Correspondência entre os terminais de entrada do microcontrolador e os sinais dos sensores. ....	36
Tabela 5-1	Parâmetros de electrofiação das membranas usadas nos testes.....	45



## Siglas e acrónimos

---

Lista de siglas e acrónimos mais usados nesta dissertação.

CLF	Clorofórmio
CS	Quitosano ( <i>Chitosan</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PC	Policarbonato
PCB	Placa de circuito impresso ( <i>Printed Circuit Board</i> )
PCL	Policaprolactona
PEG	Poli(etil)enoglicol
PEI	Poli(eter)imida
PGA	Ácido Poliglicólico ( <i>Polyglycolic acid</i> )
PHA	Polihidroxialcanoato
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMP	Polimetilpentano
POM	Polioximetileno
PP	Polipropileno
PVP	Polivinilpirrolidona





# 1. Introdução

## 1.1. Membranas tubulares e bio-reactores

Uma das actividades do grupo de Engenharia de Tecidos da FCT-UNL é o desenvolvimento de membranas tubulares biodegradáveis com estrutura adequada à maturação celular que conduza à reparação de vasos sanguíneos. Estas estruturas destinam-se a ser suturadas nas extremidades de vasos sanguíneos nativos.

O método de desenvolvimento das membranas poliméricas baseia-se na electrofiação de policaprolactona (PCL), quitosano (CS - *Chitosan*), polivinilpirrolidona (PVP) e gelatina, em diferentes proporções, de modo a potenciar a mimetização da túnica íntima, túnica média e túnica adventícia de uma artéria. Esta estrutura favorece a migração e a actividade, respectivamente, das células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos. A técnica de electrofiação permite obter fibras com diâmetros desde a ordem dos micrómetros até à dos nanómetros, que formam uma matriz porosa semelhante à matriz extracelular dos tecidos humanos, e que favorece a adesão, a proliferação e o metabolismo das células nativas.

Os substitutos de vasos sanguíneos serão compostos por várias camadas e terão uma organização que promove a regeneração do vaso sanguíneo nativo. Assim, as membranas tubulares produzidas deverão ter características controladas a nível de propriedades mecânicas, porosidade e hidrofiliidade, que sirvam de substrato a culturas celulares e que se destinem a substituir temporariamente vasos sanguíneos danificados.

O projecto desenvolvido no âmbito desta dissertação surgiu da necessidade do grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL desenvolver um sistema que permita a cultura celular em membranas tubulares. A criação de um ambiente de incubação semelhante ao que existe *in vivo* a nível de temperatura e concentração de dióxido de carbono, e com estímulos adequados, é fundamental para ensaios de cultura celular em membranas tubulares que se destinam a substituir vasos sanguíneos. A simulação da passagem do fluxo sanguíneo pelo interior da membrana tubular pode ser feita através da utilização de equipamento adequado que bombeie um fluido de forma pulsátil pelo interior da membrana, ou seja, um bio-reactor.

## 1.2. Objectivos

O principal objectivo estabelecido para este trabalho foi a elaboração de um projecto de um bio-reactor que permitisse manter uma cultura celular numa membrana tubular durante semanas e com a capacidade para gerar os estímulos mecânicos pulsados adequados ao alinhamento de células endoteliais e de músculo liso. A primeira etapa definida foi a construção de uma câmara de cultura celular. A segunda foi a elaboração de um sistema de bombeamento pulsado de um fluido. Outro objectivo do trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de monitorização da pressão, da frequência e do caudal dos pulsos aplicados às membranas.

## 1.3. Estrutura do documento

Os trabalhos desenvolvidos para que os objectivos do projecto fossem atingidos foram os seguintes:

- Identificação do problema e pesquisa bibliográfica sobre vários tipos de substitutos de vasos sanguíneos actualmente utilizados – Capítulo 2: Substitutos de vasos sanguíneos.
- Revisão de literatura, que incluiu uma pesquisa bibliográfica sobre substitutos de vasos sanguíneos, e outros projectos de bio-reactores de perfusão pulsátil que têm vindo a ser desenvolvidos noutros grupos de investigação. Foi também feito um levantamento das características mais importantes dos bio-reactores analisados – Capítulo 3: Bio-reactores para culturas celulares.
- Identificação dos elementos constituintes do bio-reactor, construção do sistema, desenvolvimento da electrónica e *software* necessários à monitorização da pressão e do caudal aplicados às membranas tubulares, ensaios de citotoxicidade aos materiais utilizados e realização de testes à fiabilidade ao bio-reactor – Capítulo 4: Desenvolvimento do bio-reactor.
- Produção de matrizes de PCL, cultura celular em matrizes planas, estudos comparativos entre cultura estática, numa caixa de Petri, e cultura dinâmica, no bio-reactor, e observação das culturas celulares por microscopia de fluorescência – Capítulo 5: Cultura celular no bio-reactor;
- Por último, foi feita uma reflexão sobre o trabalho desenvolvido e delineadas perspectivas futuras – Capítulo 6: Conclusão.

## 2. Substitutos de vasos sanguíneos

### 2.1. Doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo [1]. Dados do Instituto Nacional de Estatística publicados recentemente pela Direcção-Geral da Saúde (ver Figura 2.1) indicam que o mesmo acontece em Portugal [2].

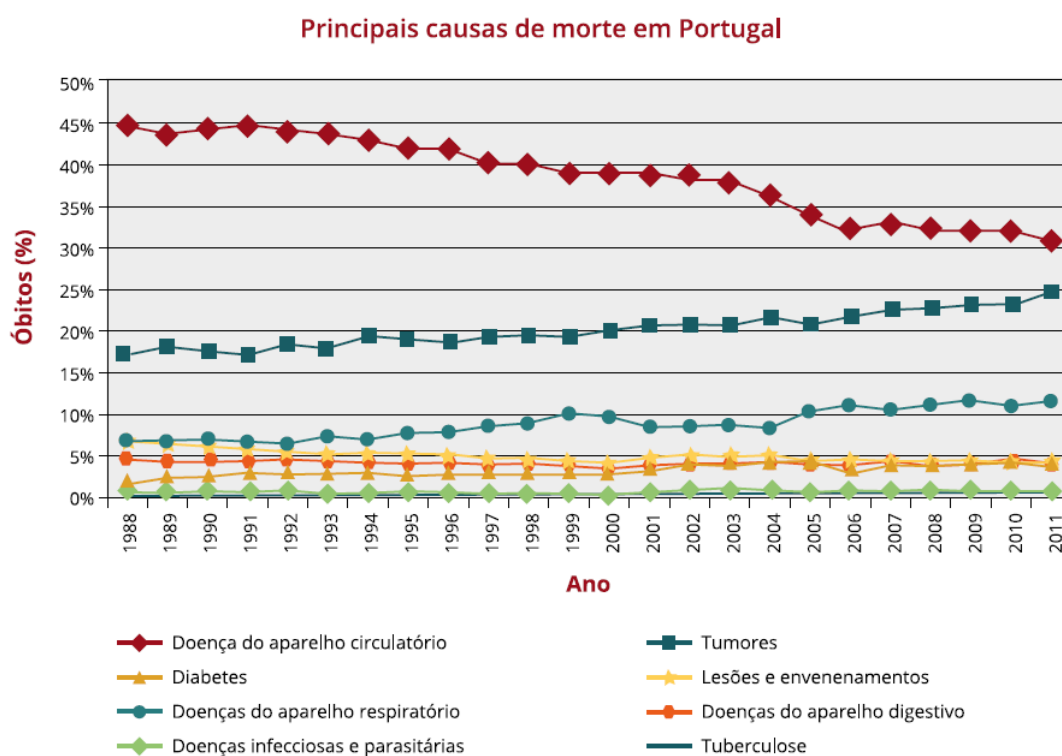


Figura 2.1 Percentagem de óbitos pelas principais causas de morte no total das causas de morte em Portugal (1988-2011). [2]

Os principais factores de risco para as patologias dos vasos sanguíneos são a aterosclerose, a hipertensão e outros como o tabagismo, uma alimentação desequilibrada e uma prevalência de colesterol de baixa densidade (LDL - *Low-density lipoprotein*) em relação ao colesterol alta densidade (HDL - *High-density lipoprotein*). Estes podem desencadear várias patologias, entre as quais se destacam pela sua maior incidência:

- Acidente vascular cerebral: Ocorre geralmente quando um coágulo ou uma parte de uma placa aterosclerótica rompe de uma outra área do corpo e se aloja dentro da vasculatura do cérebro (ver Figura 2.2 A) );
- Enfarte agudo do miocárdio: Ocorre quando uma das artérias que abastece o músculo cardíaco fica bloqueada (ver Figura 2.2 B) ). O bloqueio pode ser causado por aterosclerose, e leva à perda de contracção da porção do músculo do coração afectada;

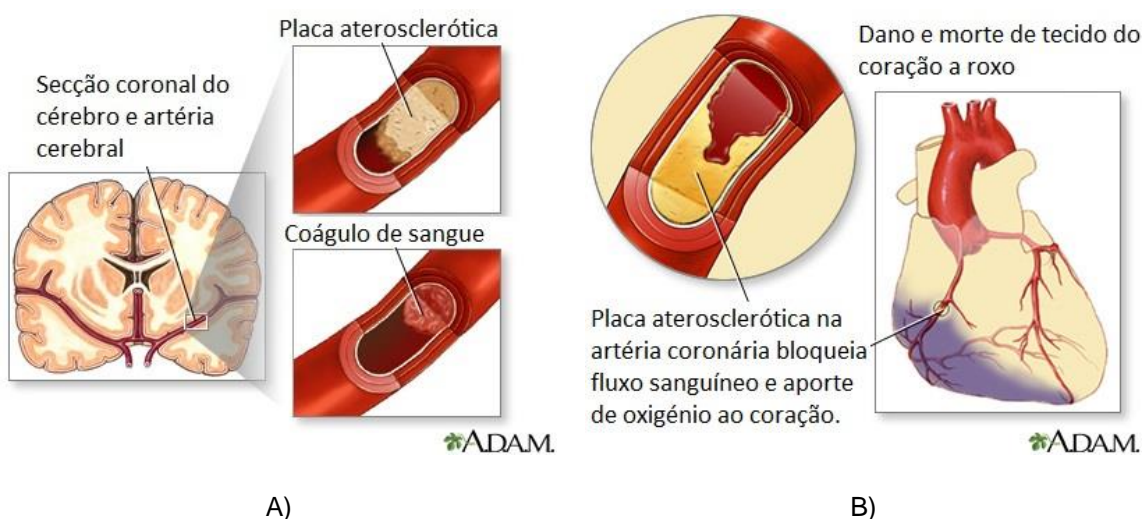


Figura 2.2 Acidentes vasculares. A) Desenvolvimento de acidente vascular cerebral (adaptado de [3]). B) Desenvolvimento de enfarte agudo do miocárdio (adaptado de [4]).

- Doenças das artérias vasculares periféricas: Ocorrem quando os vasos sanguíneos que fornecem sangue às pernas, braços ou pélvis ficam bloqueados. Estas condições podem expressar-se por claudicação intermitente ou isquemia aguda de membros.

A elevada percentagem de população afectada por doenças cardiovasculares torna a opção de tratamento um factor crítico no futuro. A revascularização cirúrgica *bypass* é uma solução corrente para este problema, que consiste na implantação de um enxerto vascular que contorna o bloqueio e restitui o fluxo sanguíneo.

## 2.2. Enxertos vasculares

Actualmente existem três principais tipos de enxertos vasculares: autólogos, sintéticos e de engenharia de tecidos. Os enxertos autólogos consistem na obtenção de vasos sanguíneos sãos de outras partes do corpo do paciente para substituição dos não funcionais. Os enxertos sintéticos já são frequentemente usados na substituição de artérias danificadas. Porém, as suas propriedades viscoelásticas diferem muito das dos vasos sanguíneos nativos, uma vez que não são permeáveis, nem possuem capacidade de se alongarem, o que dificulta a sua aplicação, por exemplo, no tratamento de crianças. A Engenharia de Tecidos tem progredido a vários níveis, nomeadamente através da utilização de procedimentos de cultura de células e da criação de ambientes *in vitro* com condições mais próximas das que se verificam no corpo humano, no sentido de criar substitutos de vasos sanguíneos com melhores características do que os sintéticos.

### 2.2.1. Enxertos autólogos

Entre 2004 e 2012 foram realizadas cerca de 25 000 cirurgias coronárias só em Portugal [2]. Os principais enxertos usados em revascularização cirúrgica coronária *bypass* são a artéria mamária interna esquerda, a veia safena magna [5] e a artéria radial [6]. As principais vantagens associadas ao uso de enxertos autólogos são o menor risco de rejeição imunológica por parte do paciente e o facto de se tratar de vasos totalmente naturais com função não-trombogénica nas monocamadas endoteliais [7]. No entanto, estes enxertos implicam cirurgia adicional, o que consequentemente aumenta o tempo de hospitalização e o risco de complicações para o doente [5]. Além disso, os pacientes podem ter falta de vasos sanguíneos adequados para transplante devido à idade ou doença. No caso da utilização de veias para substituição de artérias podem ainda ocorrer problemas de incompatibilidade, devido às suas diferenças de complacência e resistência mecânica [7]. Os problemas mencionados criam a necessidade de encontrar outras alternativas de enxertos.

### 2.2.2. Enxertos sintéticos

Os enxertos sintéticos baseiam-se em materiais que não se encontram naturalmente no corpo humano, pelo que o risco de rejeição por parte do sistema imunológico do receptor é elevado, podendo conduzir a infecções. A sua elevada susceptibilidade para induzir coagulação (por falta de uma monocamada endotelial não-trombogénica) torna-os, por si só, inadequados para substituição de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro [8].

### 2.2.3. Enxertos de Engenharia de Células e Tecidos

A engenharia de tecidos utiliza biomateriais e células para a criação de vasos sanguíneos que contornem as desvantagens apresentadas pelos enxertos sintéticos. As estruturas tubulares normalmente utilizadas oferecem apoio estrutural e permitem o crescimento, a migração e a diferenciação celulares. Em 1986, Weinberg e Bell criaram os primeiros enxertos vasculares de Engenharia de Células e Tecidos a partir de uma membrana de Dacron com colagénio embebido, e de células endoteliais, de músculo liso e fibroblastos de origem bovina [9].

Desde então têm sido utilizadas várias estratégias, materiais, tipos de células e condições de cultura com estimulação mecânica e/ou com reguladores químicos (ver Figura 2.3) para o desenvolvimento de substitutos de vasos sanguíneos. Alguns destes substitutos já foram aplicados *in vivo*, em modelos animais, tendo-se mantido desobstruídos durante alguns meses [10]–[12]. No entanto, a avaliação da adequabilidade a longo-prazo de muitas das estratégias que têm sido adoptadas implicará o acompanhamento de casos clínicos durante períodos de tempo mais longos [9]. Além disso, muitas das abordagens têm um procedimento demorado, o que limita a sua aplicação em casos urgentes.

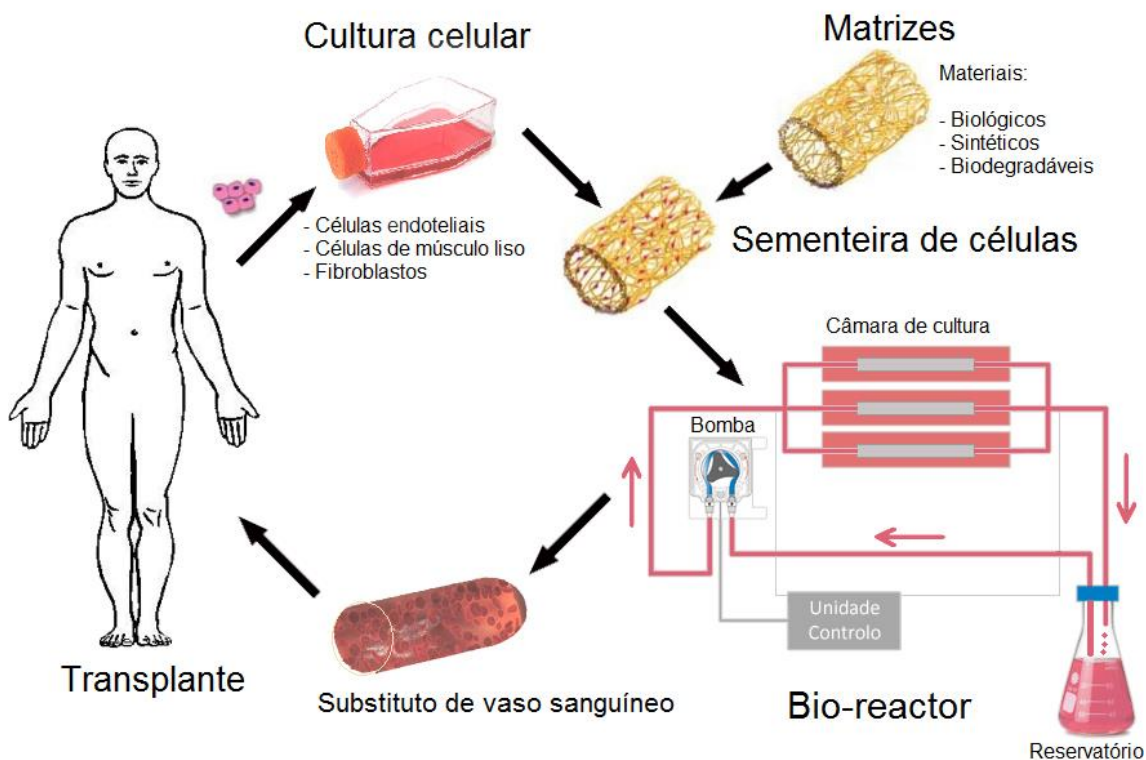


Figura 2.3 Esquema ilustrativo de abordagens usadas em engenharia de tecidos para produção e aplicação clínica de substitutos de vasos sanguíneos. (adaptado de: [9]).

Idealmente pretende-se que os enxertos estejam rapidamente disponíveis numa grande variedade de comprimentos e diâmetros, tenham custos de produção baixos, apresentem biocompatibilidade, características não-trombogénicas, adequada resistência mecânica e que se degradem à mesma taxa que o tecido natural prolifera.

### 2.2.3.1 Enxertos com matrizes de materiais não biológicos

As nanofibras e microfibras de polímero obtidas por electrofiação permitem obter matrizes (membranas) que fornecem suporte ao crescimento de células, permitindo que estas proliferem em estruturas tridimensionais (ver Figura 2.4) que exibem muitas semelhanças com a matriz extracelular dos tecidos biológicos. Diversos grupos de investigação têm usado matrizes produzidas por vários processos para cultivar células e criar substitutos de vasos sanguíneos com múltiplas camadas. No caso de matrizes biodegradáveis, vão sofrendo degradação à

medida que as células proliferam. No entanto, conseguir fazer coincidir a taxa de degradação da matriz com a taxa de crescimento celular apropriada é um aspecto desafiante. A garantia do suporte que a matriz confere é importante, de modo a evitar-se que o substituto de vaso sanguíneo sofra ruptura em condições arteriais *in vivo*.

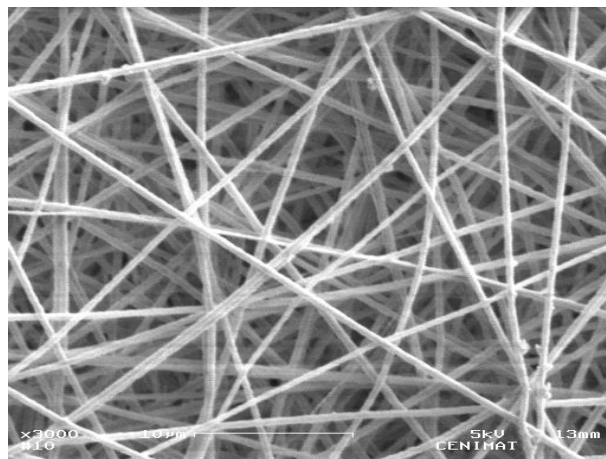


Figura 2.4 Matriz de nanofibras de policaprolactona e quitosano (dois polímeros naturais e biodegradáveis) para suporte de cultura celular.

Um exemplo de aplicação de matrizes de materiais não biológicos vem de Niklason *et al.* que usaram matrizes de ácido poliglicólico (PGA - *Polyglycolic acid*) num bio-reactor com pressão pulsátil durante oito semanas. Os vasos resultantes deste trabalho conseguiram suportar pressões superiores a 2000 mmHg [13]. Num estudo similar, Shum-Tim *et al.* “semearam” uma mistura de células de músculo liso e células endoteliais num copolímero de PGA e polihidroxialcanoato (PHA) [14]. Os vasos resultantes foram implantados em aortas de cordeiro. Cinco meses após a implantação, um dos três implantes apresentou ligeira estenose no local da anastomose.

### 2.2.3.2 *Enxertos com matrizes de materiais biológicos*

As matrizes de materiais biológicos podem consistir em matrizes acelulares obtidas a partir de fontes naturais [12] ou ser constituídas por proteínas naturais [9]. Colagénio de submucosa de intestino delgado bovino, artérias (aorta e carótida) de porco e ureteres bovinos são alguns dos componentes animais que já foram utilizados para produção de matrizes biológicas [12].

Matrizes compostas por proteínas naturais constituintes de matrizes extracelulares nativas são ideais para adesão celular (exemplos: colagénio, fibrina e fibronectina). Weinberg e Bell usaram colagénio na criação do primeiro enxerto de vaso sanguíneo. No entanto, devido à fraca resistência inerente aos géis de colagénio, os vasos sanguíneos não conseguiram suportar as variações de pressão hemodinâmica que existem no corpo humano. Na tentativa de se melhorar a resistência dos enxertos, mais tarde, foram desenvolvidas matrizes de micro e nanofibras por electrofiação a partir de colagénio e elastina, e exploradas técnicas de estimulação mecânica dinâmica [9].

### 2.2.3.3 *Enxertos vasculares sem matrizes*

Uma das abordagens possíveis na construção de substratos para cultura celular consiste na utilização de um mandril sintético, usado como estrutura à volta da qual as células vão aderindo e crescendo. Ao contrário do que acontece nas matrizes, o mandril não se integra com as células, conferindo apenas suporte às células e tecidos [5].

L'Heureux *et al.* construíram os primeiros enxertos arteriais de pequeno diâmetro adequados para cirurgia *bypass* em adultos humanos. O método utilizado dispensou o uso de biomateriais exógenos e baseou-se na cultura de fibroblastos em condições que promoveram a deposição de matriz extracelular. Por isolamento e enrolamento de camadas de células comprimidas, que se formaram no fundo dos frascos de cultura, foram criados substitutos de vasos sanguíneos anti-trombogénicos e estáveis durante oito meses *in vivo* [10].

Os substitutos de vasos sanguíneos da empresa americana *Cytograft* também são obtidos por enrolamento de finas camadas de células. Este processo envolve retirar um pequeno tecido dérmico do paciente e o cultivo dos fibroblastos, moldando-os numa estrutura tubular. Os investigadores da *Cytograft* avaliaram as propriedades mecânicas destes tecidos, chegando à conclusão que apresentam uma resistência semelhante à dos vasos sanguíneos naturais. A principal vantagem consiste no baixo risco de rejeição imunológica, por serem usadas células do próprio doente. No entanto, a principal desvantagem deste método é o tempo que é necessário para o crescimento dos vasos sanguíneos, que é de 6 a 9 meses [15].

Outra estratégia que não utiliza estruturas rígidas para fixação celular foi desenvolvida por Norotte *et al.* Neste trabalho, várias linhas de células esféricas foram impressas por um dispositivo num gel de agarose tridimensional [16]. À medida que as células esféricas crescem, vão formando uma estrutura tubular que é composta inteiramente por matéria celular. Uma limitação deste procedimento é que o sistema de vascularização não permitiu um aporte de oxigénio e nutrientes suficiente até todas as células. Como resultado, muitas sofreram apoptose.

## 2.3. Cultura celular em enxertos

Para ensaios de cultura celular em membranas tubulares que se destinam a substituir vasos sanguíneos deve-se ter em conta a necessidade de existência dos estímulos adequados. A utilização de equipamento capaz de bombear o líquido com os nutrientes necessários à cultura celular de forma pulsátil, fazendo-o passar pelo interior da membrana tubular, permite simular a passagem do fluxo sanguíneo no interior dos vasos sanguíneos. Este estímulo mecânico contribui para o alinhamento adequado das células endoteliais e de músculo liso. As células endoteliais cobrem a parede interna do vaso, tendendo a alinhar-se na direcção do fluxo sanguíneo, e reduzindo dessa forma o atrito que poderia ser criado contra a parede do vaso [17]. Já as células de músculo liso tendem a alinhar-se circunferencialmente em relação à direcção do fluxo sanguíneo [18], estimuladas pela expansão e contracção provocadas pela passagem do fluxo pulsado, e conferindo ao vaso melhores características de resistência e elasticidade.



Várias investigações concluíram que a estimulação mecânica (ex: compressão mecânica, pressão hidrodinâmica e fluxo de fluídos) é importante na modulação da fisiologia das células, contribuindo para melhorar a função de tecidos, não só cardiovasculares, mas também músculo-esqueléticos e em cartilagens, entre outros [19]. Em particular, o uso de bio-reactores de perfusão pulsátil para cultura de células de músculo liso em membranas tubulares evidenciou o aumento da sua proliferação e uma maior homogeneidade na sua distribuição pelas matrizes, comparativamente com a cultura estática [20]–[22]. Observou-se ainda aceleração na produção de fibras de colagénio, assim como a modulação do fenótipo de células de músculo liso para um estado contráctil [23].

As nanofibras produzidas por electrofiação são maleáveis, podendo originar matrizes vasculares porosas com diferentes tamanhos e formas. No entanto, os poros das matrizes são da ordem dos nanómetros, o que dificulta a infiltração das células nelas cultivadas e a difusão de nutrientes e oxigénio. O uso de bio-reactores permite melhorar a sua chegada até às células, e também promove uma melhoria na resistência das membranas à ruptura [22].

Num dos estudos, em que foi usado um sistema de perfusão pulsátil para a co-cultura de células de músculo liso e células endoteliais em matrizes, foram observadas melhorias na endotelização vascular, na retenção de fenótipos celulares diferenciados, e na proliferação celular, relativamente à cultura estática [24]. A cultura celular em bio-reactores pode ainda melhorar a composição de matriz extracelular e as propriedades mecânicas dos enxertos, nomeadamente a sua resistência, que é uma característica essencial a garantir antes da implantação em modelos *in vivo* [23].

Muitas destas conclusões basearam-se na observação e comparação entre culturas celulares sob condições dinâmicas e estáticas. Têm sido aplicadas várias técnicas para análise dos resultados obtidos, como a Microscopia Electrónica de Varrimento, que permite obter informação sobre a superfície topográfica dos enxertos; exames Histológicos, para informação sobre a morfologia dos tecidos; e testes de Imunohistoquímica, para quantificação da produção de proteínas de matriz extracelular, como por exemplo colagénio e elastina.

Outra observação resultante de estudos anteriores é que em cultura dinâmica o metabolismo celular tende a ser mais aeróbio do que em condições estáticas [21]. Existem bio-reactores de rotação, que agitam o meio de cultura, permitindo uma oxigenação mais uniforme. Alguns já demonstraram ser bastante eficazes a nível de alta incidência de proliferação celular e baixa incidência de apoptose, assim como na produção de matriz extracelular [25]. Outra forma de melhorar o transporte de oxigénio dissolvido e de nutrientes às células cultivadas em matrizes consiste na combinação de fluxo transmural com fluxo axial em bio-reactores [26].

Em Engenharia de Tecidos, a produção de tecidos funcionais e a sua difusão a nível clínico confrontam-se com obstáculos relacionados com os riscos de contaminação, os elevados custos de produção e a sua aplicação em larga-escala. O uso de bio-reactores é promissor na resolução de alguns destes problemas, pois o seu funcionamento automático reduz os custos de produção e facilita o manuseamento e a produção de enxertos de Engenharia de Tecidos em larga escala [27]. A melhoria na qualidade dos tecidos produzidos em bio-reactores está relacionada com a capacidade de reprodução dos factores do corpo humano *in vivo*. No entanto, o projecto do bio-reactor óptimo e as condições de cultura mais apropriadas continuam por se conhecer.



### 3. Bio-reactores para culturas celulares

Os bio-reactores são geralmente definidos como equipamentos nos quais se desenvolvem processos biológicos e/ou químicos em condições controladas. Já são correntemente utilizados em processos de fermentação na indústria, no tratamento de águas residuais e na produção de fármacos e proteínas recombinantes (ex: antibióticos, factores de crescimento e vacinas) [27]. Estes equipamentos permitem alcançar um nível de reprodutibilidade, controlo e automatismo fundamentais para aplicações em larga-escala.

No contexto da engenharia de tecidos, os bio-reactores são sistemas que proporcionam um ambiente de cultura celular o mais semelhante possível ao que existe no corpo humano. Consistem normalmente num sistema com uma câmara de cultura, na qual o pH, a temperatura, a pressão, os nutrientes e os resíduos metabólicos produzidos pelas células são controlados, de modo a haver optimização das condições favoráveis à proliferação e à viabilidade celular.

#### 3.1. Bio-reactores de perfusão pulsátil

Ao longo da última década têm sido concebidos vários bio-reactores de perfusão pulsátil que permitem a cultura de células no interior de enxertos. Nesta secção, os sistemas de bio-reactores apresentados foram seleccionados pela sua relação com as características que se pretendia implementar no bio-reactor a desenvolver.

Hahn *et al.* (2007) [28] encapsularam células progenitoras de músculo liso em hidrogéis baseados em polietilenoglicol (PEG - *poly(ethylene glycol)*), estimulando-as através de um sistema de condicionamento mecânico. Este é composto por uma bomba peristáltica (ver Figura 3.1 - (4)), que actua num tubo de silicone, gerando o fluxo de meio de cultura pretendido. De seguida, o fluido passa para um frasco de vidro de 100 mL com tampa, que serve de “câmara de amortecimento” (ver Figura 3.1 – (5)) para atenuar as oscilações do fluxo criadas pela bomba peristáltica. Depois, passa pela bomba pulsátil (ver Figura 3.1 – (1)) que, ao actuar sobre o tubo, produz os pulsos de pressão desejados. Posteriormente, o meio de cultura passa pelas matrizes colocadas na câmara de cultura (ver Figura 3.1 – (2)), sendo a

pressão experimentada por estas monitorizada por um sensor de pressão. Finalmente o meio de cultura passa para o reservatório, seguindo-se um novo ciclo (ver Figura 3.1 - (3)). A existência de válvulas anti-retorno (ver Figura 3.1 – (6)) à entrada e à saída da bomba pulsátil impede o refluxo do meio de cultura em resposta à acção desta.

Os resultados obtidos mostraram que este bio-reactor foi eficaz na melhoria da qualidade dos substitutos de vasos sanguíneos criados, afectando positivamente o seu conteúdo em colagénio e as suas propriedades mecânicas.

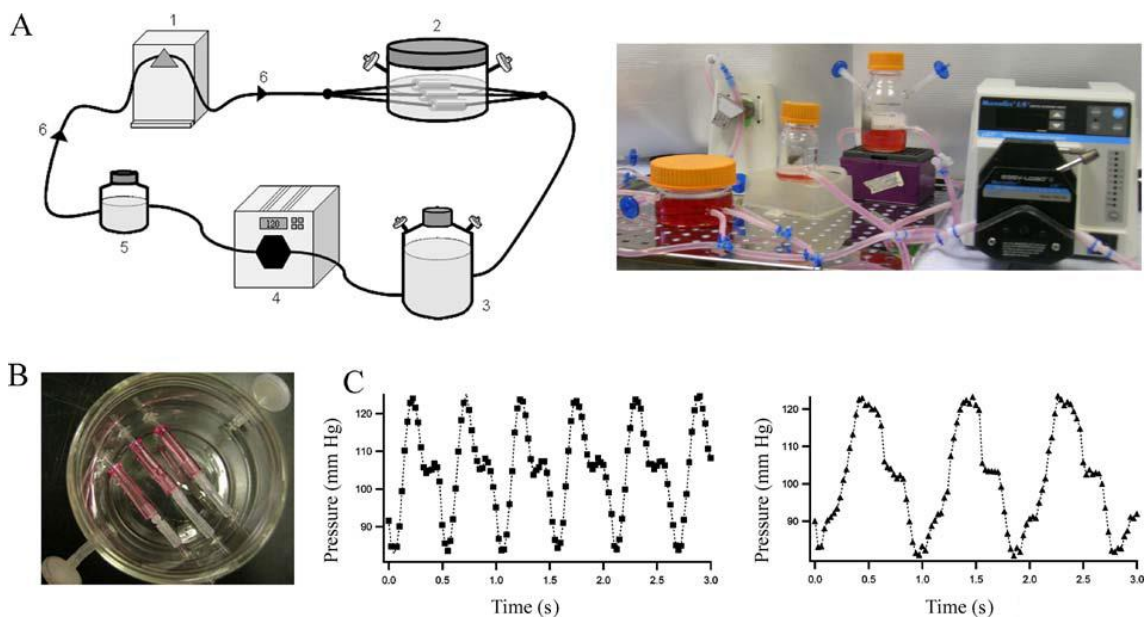


Figura 3.1 Bio-reactor de perfusão pulsátil. (A) (esquerda) Esquema do sistema, que inclui (1) uma ou mais bombas pulsáteis, (2) uma câmara de cultura, (3) um reservatório de meio, (4) uma bomba peristáltica, (5) uma câmara de amortecimento, (6) válvulas anti-retorno; (direita) Fotografia do sistema de bio-reactor. (B) Fotografia da câmara de cultura. (C) Representação de formas de onda de pressão geradas usando o bio-reactor definido para simular condições pulsáteis fetais (esquerda) ou adultas (direita). [28]

Iwasaki *et al.* (2008) [29] desenvolveram um bio-reactor de perfusão pulsátil para produção de substitutos arteriais robustos e elásticos de três camadas. O sistema permite regular a pressão, o caudal circulatório, a concentração de dióxido de carbono e o pH do meio de cultura. O esquema de montagem baseia-se num modelo do ventrículo esquerdo, com válvulas feitas de material sintético a simular as válvulas aórtica e mitral. Os restantes componentes são tubos de silicone complacentes, uma unidade para controlo da resistência periférica, uma unidade de troca de gás, uma câmara de cultura, um reservatório, um sensor de pressão e um sensor de caudal (ver Figura 3.2). Há um fluxo principal que passa pela superfície interna do substituto de vaso sanguíneo e um fluxo secundário que o perfunde externamente. O fluxo secundário é regulado por uma segunda bomba que gera um fluxo contínuo.

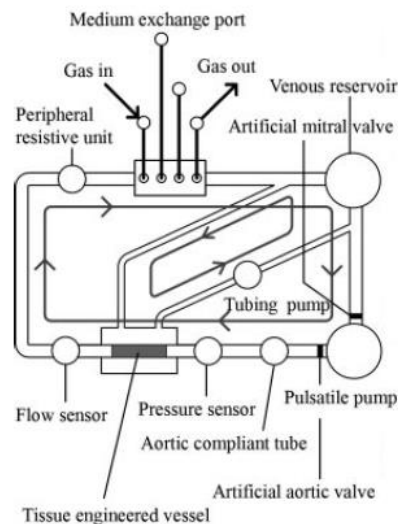


Figura 3.2 Esquema de bio-reactor pulsátil baseado em hemodinâmica desenvolvido por Iwasaki *et al.* [29]

Chouinard *et al.* (2009) [30] criaram um bio-reactor capaz de criar uma grande variedade de condições fisiológicas ou patológicas, e que permite monitorizar e controlar o pH, a concentração de oxigénio dissolvido, a temperatura, a pressão, a frequência e o caudal, em tempo-real. Os seus principais componentes são uma bomba peristáltica, uma câmara de amortecimento (para retenção de bolhas e entrada de meio de cultura) (ver Figura 3.3 - (2)), um pulsador pneumático, uma unidade de aquecimento (ver Figura 3.3 – (4)), uma unidade de renovação de gás (ver Figura 3.3 – (5)), uma câmara de cultura (ver Figura 3.3 – (6)), garrafas que contém meio de cultura, tubagem e sensores de caudal, de oxigénio difundido, de pH e de pressão. O sistema dispõe ainda de um computador ligado a um módulo de conversão de sinais analógicos em sinais digitais e vice-versa (A/D-D/A) e com *software* LabVIEW instalado.

O bio-reactor permitiu a proliferação e a dispersão uniforme de células endoteliais da veia do cordão umbilical num gel de fibrina espesso, promovendo um ambiente adequado para cultura celular de alta densidade.



Figura 3.3 Bio-reactor de perfusão pulsátil para cultura celular de alta densidade em 3D de Chouinard *et al.* (1) sistema pulsador, (2) câmara de amortecimento, (3) medidor de fluxo mássico, (4) unidade de aquecimento, (5) unidade de renovação de gás, (6) câmara de cultura celular. [30]

O bio-reactor de Wang *et al.* (2011) [23] é constituído por vários elementos mecânicos, entre os quais uma bomba peristáltica, que gera um fluxo aproximadamente contínuo e uniforme, e uma bomba pulsátil, que gera um fluxo pulsado (ver Figura 3.4).

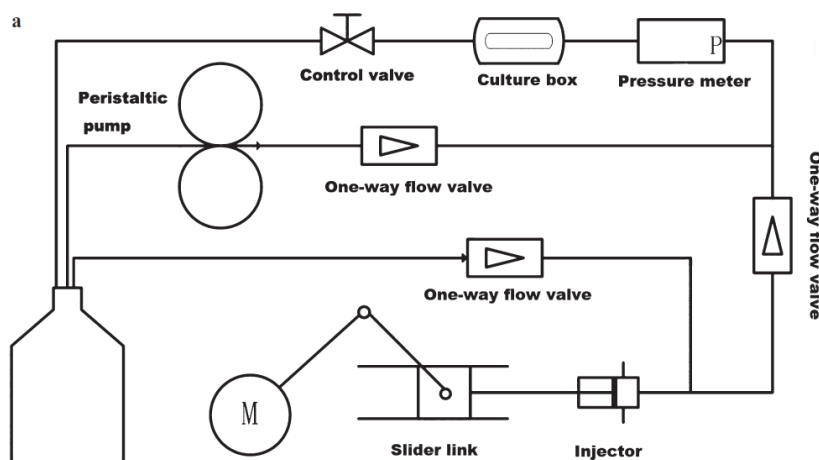


Figura 3.4 Esquema simbólico de funcionamento do bio-reactor de cultura pulsátil criado por Wang *et al.* [23]

O sistema é facilmente desmontável, esterilizável e reinstalável, e não se observou contaminação por fungos ou bactérias durante o período de cultura. Foram levados a cabo estudos comparativos entre cultura estática e cultura dinâmica durante duas semanas, que indicaram que a proliferação das células cultivadas em condições pulsadas superou a proliferação da cultura em condições estáticas após cinco dias.

Song *et al.* (2012) [31] criaram um bio-reactor para desenvolvimento de substitutos vasculares de pequeno diâmetro (< 4 mm). O sistema produz estímulos mecânicos e proporciona um fluxo similar ao fisiológico. Os principais componentes do bio-reactor são uma câmara de cultura, um reservatório, uma unidade de renovação de meio, uma bomba peristáltica, uma bomba pulsátil, um sensor de pH, um sensor de oxigénio dissolvido e um sistema de controlo das condições do meio de cultura (ver Figura 3.5). O sistema dispõe de dois ciclos de circulação. No ciclo de incubação, uma bomba pulsátil bombeia continuamente o meio de cultura, fornecendo nutrientes às células cultivadas na câmara de cultura. E no ciclo de renovação de meio, uma bomba peristáltica conduz o meio de cultura para o renovador gás/líquido e líquido/líquido, permitindo reabastecê-lo de oxigénio e nutrientes.

Os resultados de ensaios mecânicos e de bioquímica confirmaram que este bio-reactor é adequado para o desenvolvimento de substitutos de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro.

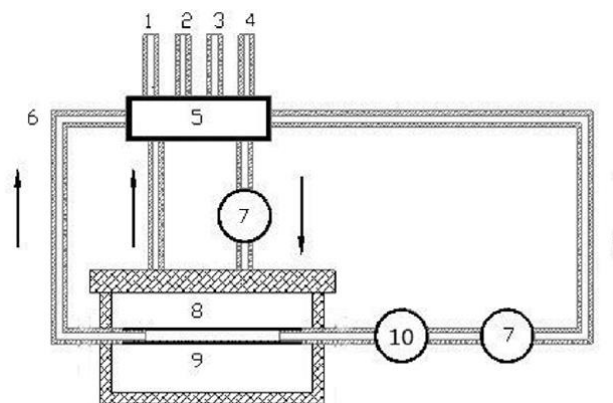


Figura 3.5 Esquema de um bio-reactor de perfusão desenvolvido por Song *et al.* (1) entrada de ar, (2) saída de ar, (3) entrada de fluido, (4) saída de fluido, (5) renovador gás/líquido e líquido/líquido, (6) tubo de silicone, (7) bomba com motor, (8) câmara de cultura, (9) enxerto de engenharia de tecidos, (10) sensor de pressão. [31]

O bio-reactor desenvolvido por Cho Mun *et al.* (2013) [22] consiste num sistema de perfusão constituído por uma bomba peristáltica (ver Figura 3.6 - (1)) com opção de duas cabeças de bomba diferentes, uma válvula doseadora (ver Figura 3.6 - (2)) que controla o diâmetro interno do tubo por oclusão, uma câmara de cultura (ver Figura 3.6 - (3)), tubagem (ver Figura 3.6 - (4)) e um reservatório de meio de cultura.

O sistema foi criado para a produção de enxertos vasculares com diâmetro interno de 4 mm, promovendo um ambiente adequado para a adesão e proliferação de células de músculo liso em matrizes de nanofibras obtidas por electrofiação. Os resultados mostraram que a cultura dinâmica no bio-reactor melhorou a estrutura tubular e as propriedades bioquímicas dos enxertos, comparativamente com a cultura estática.

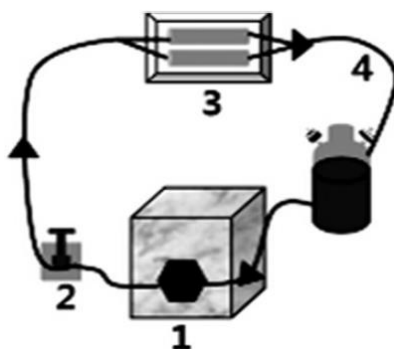


Figura 3.6 Esquema do bio-reactor de Cho Mun *et al.* (1) bomba peristáltica com opção de duas cabeças de bomba, (2) válvula doseadora, (3) câmara de cultura e (4) tubagem. [22]

Diamantouros *et al.* (2013) [32] construíram um bio-reactor para o condicionamento de enxertos vasculares de engenharia de tecidos sob condições semelhantes às fisiológicas, e que permite a monitorização das condições do sistema (pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  e temperatura).

Tal como representado no esquema (ver Figura 3.7), o bio-reactor apresenta um circuito principal (seta larga) e um circuito secundário (seta estreita). No circuito principal existe uma

bomba centrífuga (B), que recebe meio de cultura do reservatório (A) e que o bombeia, originando um fluxo não-pulsado que passa pelo interior dos enxertos na câmara de cultura (F). De seguida, o fluxo passa pela câmara de pulso (H), que gera pulsos de pressão. A existência de grampos na tubagem (C) serve para aumentar a resistência hidráulica do circuito. O sistema de monitorização de fluxo inclui sensores de fluxo (D), de pressão (E) e de pH, oxigénio e dióxido de carbono (I). O circuito secundário serve para fazer a perfusão da superfície externa do enxerto. O fluxo bombeado pela bomba centrífuga (B) ramifica-se por um tubo mais fino, depois percorre a câmara de cultura e regressa ao circuito principal antes do reservatório (A).

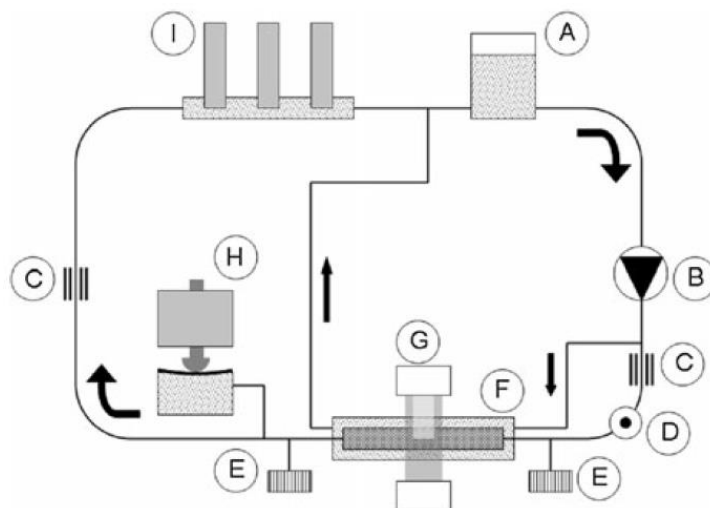


Figura 3.7 Esquema do bio-reactor de perfusão pulsátil de Diamantouros *et al.*. (A) Reservatório de meio de cultura, (B) Bomba de circulação, (C) Grampo de tubo, (D) Sensor de fluxo, (E) Sensor de pressão, (F) Câmara de cultura, (G) Micrómetro óptico, (H) Gerador de pulso e (I) Sensores de oxigénio, dióxido de carbono e pH. [32]

## 3.2. Principais características de bio-reactores

### 3.2.1. Câmara de cultura

Numa câmara de cultura de um bio-reactor, as células devem estar imersas num meio nutriente a temperatura constante de cerca de 37 °C e com uma atmosfera de 5 % de dióxido de carbono. De modo a que sejam asseguradas estas condições, a câmara deve estar inserida num ambiente com temperatura e percentagem de dióxido de carbono atmosférico controlados, ou ter os seus próprios sistemas de controlo destes parâmetros.

A câmara deve apresentar alguma transparência, de modo a permitir a observação directa dos ensaios durante o período de condicionamento dos enxertos e a detecção de alterações de pH do meio de cultura por alteração da sua cor. Vários materiais transparentes têm vindo a ser utilizados na construção de câmaras de cultura, por exemplo: polieterimida (PEI) [33], polimetilmetacrilato (PMMA) [25], [31], [32], [34] policarbonato (PC) [35] e polioximetileno (POM) [32].

Uma característica comum a todos os materiais mencionados é a biocompatibilidade. Destes, há-que salientar que o PMMA tem a vantagem de ser transparente, económico e fácil de



trabalhar. No entanto, não é autoclavável e a sua imersão em etanol a 70 % pode causar fissuras e enfraquecimento [36]. Alguns exemplos de outros materiais transparentes e resistentes à autoclavagem em ciclos repetidos são os polímeros: polimetilpentano (PMP - usado, por exemplo, no fabrico de goblés, provetas, caixas de Petri e tubos de Eppendorf) e polipropileno (PP - usado, por exemplo, no fabrico de tubos Falcon) [36].

A câmara de cultura deve ainda ser fácil de manusear para um operador não especializado. Quanto à estrutura, as dimensões da câmara de cultura devem ser tais que o consumo de meio de cultura no decorrer dos ensaios seja minimizado.

### **3.2.2. Sensores de pressão**

Após uma revisão da literatura, foram identificadas as zonas do circuito em que são tipicamente instalados os sensores de pressão. Concluiu-se que, em alguns projectos de bio-reactores, o sensor de pressão foi posicionado à entrada ou à saída da câmara de cultura [29]–[31]. Outros grupos de investigação preferiram usar dois sensores de pressão, um à entrada e outro à saída da câmara de cultura, de modo a que a queda de pressão no interior da câmara conseguisse ser determinada. Os enxertos foram posicionados, aproximadamente entre os dois sensores, de modo a que o valor médio dos dois sinais correspondesse aproximadamente ao valor da pressão no enxerto [21], [32]. O sensor de pressão também já foi posicionado em paralelo com as membranas tubulares [28].

### **3.2.3. Sensor de caudal**

O caudal aplicado às células afecta o crescimento celular, pois é através do meio de cultura circulante que os nutrientes chegam às células. A monitorização do caudal é importante para que se evite a aplicação de caudais elevados às membranas tubulares no início do período de cultura celular. Os sensores de caudal permitem ajustar a tensão de corte aplicada às células.

### **3.2.4. Sistema de aquecimento e controlo de temperatura**

Uma grande parte dos bio-reactores analisados é parcialmente instalável e funciona no interior de uma incubadora comum, beneficiando assim de uma atmosfera controlada a 5 % de CO<sub>2</sub> e de uma temperatura constante (37 °C) [20], [21], [25], [28], [32]–[34]. Esta solução apresenta a vantagem de ser mais simples de implementar, uma vez que tira partido dos sistemas de controlo de temperatura, de dióxido de carbono e de humidade próprios de uma incubadora. No entanto, por questões de esterilidade, só o equipamento necessário deve estar no interior desta, obrigando a que tubos e cabos tenham que atravessar as suas paredes. Mais ainda, existem sistemas de bombeamento que têm de ser instalados no exterior da incubadora, por os seus requisitos de funcionamento não suportarem a humidade ou a temperatura que se verifica no interior da incubadora. Além disso, o funcionamento de alguns sistemas de bombeamento provoca vibrações que podem perturbar as culturas celulares no interior da incubadora.

Também já foram criados alguns bio-reactores autónomos, ou seja, que não requerem o uso das tradicionais incubadoras [30]. Nestes casos é necessário providenciar o aquecimento do meio de cultura circulante, para que a câmara de cultura se mantenha à temperatura desejada. Chouinard *et al.* [30] utilizaram um tubo de vidro em espiral, dentro do qual o meio de cultura circula e é aquecido por condução num reservatório com água quente.

### 3.2.5. Sistema de controlo de gases

Em bio-reactores, os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dissolvidos podem ser controlados de modo a que o pH e a concentração de oxigénio se mantenham próximos das condições fisiológicas normais. Alguns bio-reactores dispõem de um sistema próprio que efectua esse controlo (ver Tabela 3-1).

Tabela 3-1 Parâmetros (pH e dissolução de O<sub>2</sub>) ajustados em sistemas de controlo de gases de bio-reactores.

Parâmetro	Chouinard <i>et al.</i> [30]	Iwasaki <i>et al.</i> [29]	Song <i>et al.</i> [31]
pH	7,40 ± 0,05	7,415 ± 0,005	7,3 ± 0,1
Oxigénio dissolvido (mg/mL)	13±1	n/a	6,8 ± 0,7

No bio-reactor de Song *et al.* [31] os valores medidos pelos sensores de pH e de difusão de oxigénio são enviados para um sistema que controla uma válvula que ajusta o fluxo de oxigénio, azoto e dióxido de carbono. Os valores de pH podem estar entre 7,2 e 7,4. Quando pH < 7,2, o gás com uma mistura de oxigénio e azoto (1:1) flui e pára quando pH = 7,3; e se pH > 7,4 o dióxido de carbono flui e pára quando pH = 7,3. A concentração de oxigénio foi definida entre 6,1 e 7,5 mg/L. Se a concentração de oxigénio é mais baixa do que 6,1 mg/L, o oxigénio flui e pára quando é atingido o valor de 6,8 mg/L; E quando a concentração de oxigénio é mais elevada do que 7,5 mg/L, o azoto flui e pára quando a concentração de oxigénio atinge 6,8 mg/L.

### 3.2.6. Sistema de bombeamento pulsado

O sistema de bombeamento pulsado de meio de cultura permite transmitir um estímulo mecânico aos substitutos de vasos sanguíneos semelhante ao que acontece nos vasos sanguíneos nativos. Os principais parâmetros de vários bio-reactores analisados (frequência, pressão, caudal e diâmetro da matriz) encontram-se resumidos na Tabela A.1, no Apêndice A .

No estudo de Diamantouros *et al.* [32], os enxertos desenvolvidos no bio-reactor foram submetidos a frequências de fluxo pulsátil entre 0 Hz e 5 Hz. Até 2 Hz, a forma dos pulsos de pressão obtidos foi semelhante à forma dos pulsos de pressão da artéria braquial, com pressões a variar entre 80 mmHg e 120 mmHg.

Sabe-se que, nos estágios iniciais, estímulos de baixa pressão e alta frequência de fluxo pulsátil contribuem para melhorar a diferenciação e desenvolvimento de substitutos de tecidos cardiovasculares [31]. A aplicação de elevados caudais numa fase prematura pode reduzir o número de células em crescimento na matriz, atrasando e fragilizando o desenvolvimento do tecido [33]. Por estas razões, Cho Mun *et al.* [22] dividiram o período de cultura (catorze dias) em quatro períodos com diferentes caudais e pressões (ver Tabela 3-2) aplicados por uma bomba peristáltica. Na primeira semana foi usada uma cabeça da bomba peristáltica com três roletes. Após este período, esta foi trocada por uma cabeça com apenas um rolete.

Tabela 3-2 Pressões e caudais aplicados em cada fase do período de cultura no bio-reactor de Cho Mun *et al.*: aumento gradual

Dias	Caudal da bomba peristáltica (mL/min)	Pressão (mmHg)
1 - 7	↗ de 30 para 80	↗ de 16 para 25
8	80	50 (min) / 60 (máx)
9 - 10	↗ de 80 para 120	↗ até 80 (min) / 120 (máx)
11 - 14	120	80 (min) / 120 (máx)

No estudo de Cho Mun *et al.*, o uso de uma única bomba peristáltica em combinação com uma válvula doseadora foi suficiente para que as curvas de pressão correspondessem às da pulsação fisiológica. A possibilidade de alteração da cabeça da bomba peristáltica permitiu um melhor ajuste das características de pulsação. Desta forma, obtiveram um bio-reactor com pressão pulsátil controlável, fácil de manusear e menos dispendioso do que o habitual. Engbers-Buijtenhuijs *et al.* [21] também usaram uma bomba peristáltica na construção do seu bio-reactor, tendo obtido formas de onda de pressão semelhantes às observadas nas artérias carótidas humanas.

Da análise dos sistemas de bombeamento realizada, conclui-se que o uso de uma bomba peristáltica poderá ser suficiente para produzir pulsos de pressão semelhantes aos fisiológicos, pois já foram criados outros bio-reactores deste modo com resultados satisfatórios [21], [22]. Nos estágios iniciais do desenvolvimento dos enxertos deve-se aplicar estímulos de baixa pressão [31], baixo caudal [33] e alta frequência [31] de fluxo pulsátil para uma melhor diferenciação e desenvolvimento celular.

### 3.2.7. Meio de cultura

Os meios de cultura celular têm geralmente a função de substituir um fluido biológico, presente no ambiente fisiológico das células *in vivo*. Os principais componentes tipicamente presentes em meios de cultura são: água, sais minerais, substâncias energéticas, proteínas, aminoácidos, vitaminas, *buffers* e substâncias antifúngicas/antibacterianas.

Os meios de cultura mais simples são soluções-tampão iônicas, sendo normalmente utilizados para isolamento e manipulação de células, mas não permitindo a sua sobrevivência a longo-prazo. O suplemento do meio de cultura com aminoácidos, vitaminas, soro ou albumina e antibióticos permite prolongar o crescimento celular *in vitro*.

Os nutrientes do meio de cultura, como a glucose, devem ser mantidos a concentrações suficientemente elevadas para abastecerem a cultura celular. Metabolitos, como o lactato, devem ser controlados, pois as suas altas concentrações inibem o crescimento celular.

Bactérias, fungos e micróbios patogénicos podem facilmente destruir a cultura de interesse se entrarem na câmara de cultura, por isso é comum o uso de antibióticos no meio de cultura para prevenir o crescimento de organismos indesejáveis.

A filtração do meio de cultura pode ser conseguida através de um ozonizador - um purificador que usa ozono para matar bactérias e filtrar contaminantes [31]. A utilização de uma câmara de

fluxo laminar para a montagem do bio-reactor [28], [31] e para procedimentos de cultura celular [30] também é uma forma de prevenir potenciais contaminações.

Em bio-reactores, o período de renovação de meio de cultura depende da taxa de degradação dos aminoácidos que o constituem, da capacidade do reservatório e do período da incubação. Pode não ser necessário a renovação do meio de cultura. Mas também pode ser preciso fazer-se uma substituição total ou parcial do meio de cultura semanalmente [29], ou a cada três dias [20], [21], [28], no caso de serem utilizados aminoácidos mais susceptíveis à degradação.

### **3.2.8. Esterilização**

A autoclavagem é uma das técnicas de esterilização frequentemente utilizadas [28], [32], [33], [37]. No caso da aplicação deste método é necessário ter em conta que os materiais utilizados devem ser resistentes a elevadas temperaturas (ex: polycarbonato (PC), silicone e aço inoxidável). De notar que, antes da autoclavagem, o polycarbonato deve ser lavado cuidadosamente, pois resíduos de detergente podem causar fissuras ou manchas.

Para materiais menos resistentes a elevadas temperaturas, a esterilização por plasma com peróxido de hidrogénio [32] ou com gás óxido de etileno [24], [31] podem ser alternativas. O óxido de etileno é utilizado para esterilizar materiais sensíveis ao calor ou à humidade. No entanto, apresenta a desvantagem de poder deixar resíduos tóxicos nos itens esterilizados [38]. Além disso, esta técnica requer uma sala de esterilização apropriada (que inclua chuveiros lava-olhos, extintores, sistema de ventilação e paredes à prova de explosão) e o uso de equipamento de protecção individual [38], o que está fora do alcance dos meios que poderão ser utilizados para este projecto. A esterilização por plasma com peróxido de hidrogénio é um método que ocorre a baixas temperaturas, não-tóxico, mas muito dispendioso. Assim, também não se torna viável neste contexto.

O laboratório de Engenharia de Células e Tecidos dispõe de um autoclave, pelo que a autoclavagem é um possível método de esterilização a adoptar. A esterilização por imersão dos componentes do sistema em etanol a 70 % também é uma alternativa viável. Assim sendo, os materiais utilizados para a construção do bio-reactor devem suportar repetidos ciclos de autoclavagem ou de banho de imersão em etanol a 70 %.

Em bio-reactores em que o meio contacta directamente com componentes da bomba de perfusão são frequentemente observadas contaminações em culturas prolongadas (por um tempo aproximadamente superior a 72 h). Para prevenção de contaminações, *Hahn et al.* [28] optaram por ter ambas as bombas (pulsátil e peristáltica) a executar a sua acção directamente no tubo de circulação de meio do seu bio-reactor.

### **3.2.9. Período de incubação**

Os períodos de incubação tipicamente usados em bio-reactores são de 12 a 14 dias [21]–[24], [31], [32]. Em certas condições, é possível que se obtenham resultados conclusivos após 7 dias [18]. Também já foram realizados estudos em que a cultura celular foi prolongada por 7 a 9 semanas [20], [28], [39].

## 4. Desenvolvimento do bio-reactor

Uma das premissas no desenvolvimento do bio-reactor de perfusão pulsátil era que este permitisse manter uma cultura celular numa membrana tubular durante algumas semanas e que tivesse capacidade para gerar um fluxo que induzisse estímulos mecânicos adequados ao desenvolvimento celular.

Pretendia-se que o grupo de Engenharia de Tecidos tivesse ao dispor um sistema de condicionamento de membranas tubulares com estímulos pulsados que favorecessem o alinhamento de células endoteliais e de músculo liso. O equipamento deveria ser capaz de simular a passagem do fluxo sanguíneo pelo interior da membrana tubular. Segundo estudos anteriores, referidos na Secção 2.3, a previsão seria de que as células endoteliais tenderiam a alinhar-se na direcção do fluido de meio de cultura, e que as células de músculo liso se alinhassem circunferencial em relação à direcção do fluxo, devido ao estímulo de expansão e contracção provocado pela sua passagem.

O projecto incluiu a construção de uma câmara de cultura celular e do sistema de bombeamento pulsado de meio de cultura, com a possibilidade de monitorização da pressão e do caudal aplicados às membranas tubulares. Para tal, foram estabelecidos alguns requisitos, segundo os quais o bio-reactor deveria:

- a) Ser construído a partir de materiais, equipamentos e acessórios esterilizáveis, e que fossem fáceis de montar sob condições assépticas;
- b) Possibilitar a cultura celular e o condicionamento de membranas tubulares sob condições pulsáteis;
- c) Permitir monitorizar a pressão e o caudal do meio de cultura que passa internamente pela membrana tubular;
- d) Permitir um fácil ajuste dos pulsos de pressão e do valor do caudal aplicados à membrana tubular;

- e) Ter parâmetros ambientais controlados (como temperatura, humidade e concentração de CO<sub>2</sub>);
- f) Ser fácil de manusear;
- g) Futuramente possibilitar a perfusão da superfície externa da membrana tubular.

O alcance dos objectivos definidos nas alíneas anteriores significa uma contribuição para que a aplicação clínica dos enxertos vasculares que estão a ser desenvolvidos pelo grupo de Engenharia de Tecidos da FCT-UNL fique mais próxima da sua concretização.

No projecto do bio-reactor, em primeiro lugar foi necessário identificar o equipamento e os acessórios necessários à construção do sistema. Para tal, foi desenhado um esquema ilustrativo do circuito a implementar (ver Figura 4.1).

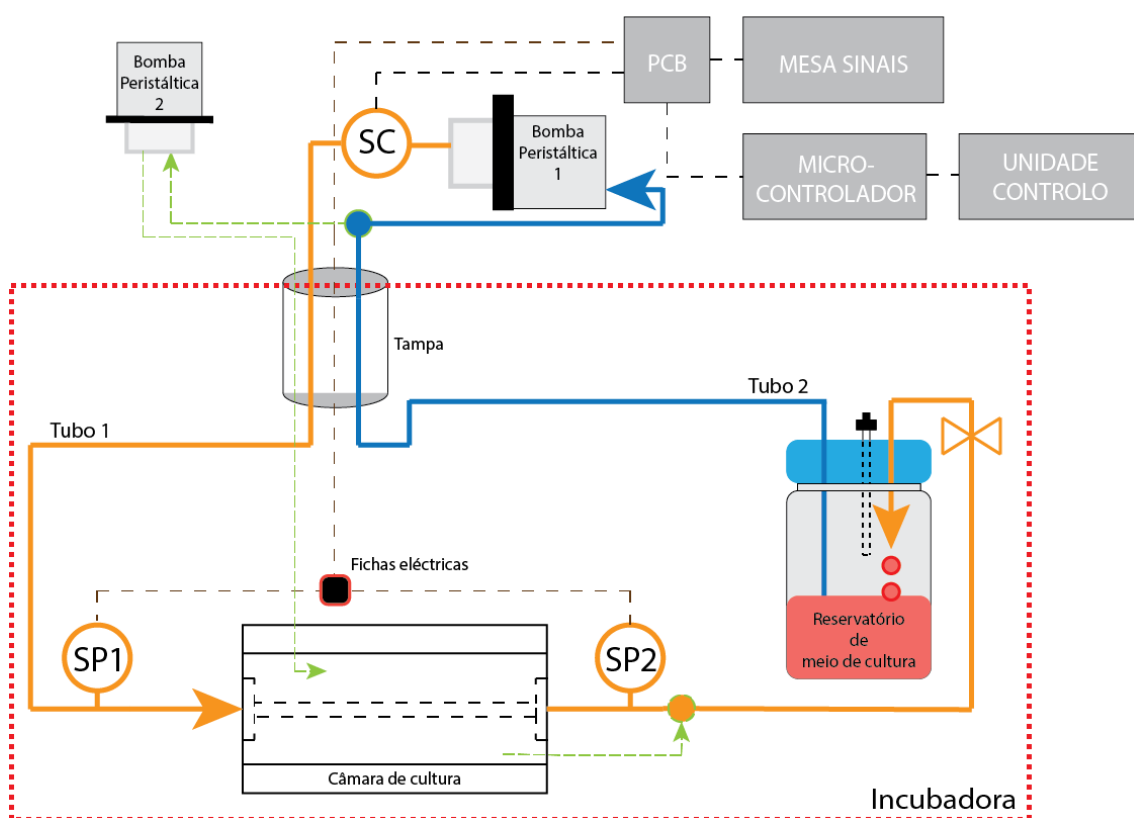


Figura 4.1 Esquema do bio-reactor. SC – Sensor de Caudal; SP1 – Sensor de Pressão 1; SP2 – Sensor de Pressão 2; PCB – Placa de Circuito Impresso (*Printed Circuit Board*).

Tal como se pode observar na Figura 4.1, no circuito principal (representado pela linha azul e pela linha laranja) o fluido é forçado a sair do reservatório devido à actividade de uma bomba peristáltica 1. Assim, o fluxo de meio de cultura que circula no tubo de silicone (tubo 2 – linha azul) é conduzido do reservatório até ao exterior da incubadora, onde é impulsionado por acção dos roletes da bomba peristáltica 1. De seguida, o meio de cultura passa a ser conduzido por um tubo de silicone que o transporta até ao interior da incubadora (tubo 1 – linha laranja). Antes de voltar a entrar na incubadora, o fluxo é monitorizado pelo sensor de caudal (SC). Já no interior da incubadora, é monitorizado pelo primeiro sensor de pressão (SP 1).

Depois, passa para a câmara de cultura, onde estimula mecanicamente as membranas tubulares. Devido à entrada de fluido novo, parte do que está no interior da câmara de cultura é obrigado a sair pelo furo do lado oposto, regressando ao reservatório. À saída da câmara de cultura existe um segundo sensor para monitorização da pressão (SP 2). No segmento de ligação entre a câmara de cultura e o reservatório (tubo 1 - linha laranja) é utilizada uma válvula que permite controlar a pressão mecânica de estrangulamento do tubo. Esta possibilita a adição de resistência ao circuito, permitindo um ajuste da pressão.

A fonte de alimentação eléctrica da bomba peristáltica, a mesa de sinais, a placa de circuito impresso (PCB – *Printed Circuit Board*) e o microcontrolador encontram-se no exterior da incubadora. Deste modo, a sua electrónica fica protegida da humidade que se verifica no interior. A conexão entre os sensores de pressão (posicionados à entrada e à saída da câmara de cultura) e o exterior da incubadora é efectuada com recurso a cabos de condutores (representados a linha tracejada castanha) e a fichas eléctricas. O cabo que atravessa a tampa da incubadora conduz a alimentação (+ 10 V e GND), vinda da mesa de sinais para ambos os sensores, e transporta os sinais de saída dos sensores até à PCB.

Inicialmente pensou-se em implementar dois circuitos de meio de cultura, um designado por principal e outro por secundário (representado a linha verde na Figura 4.1). No entanto, optou-se por aplicar apenas fluxo primário às membranas, de modo a conseguir-se um melhor controlo dos parâmetros de pressão e de caudal. Assim, não havendo interferência de efeitos causados pelo fluxo secundário, a análise dos resultados obtidos seria simplificada.

O circuito secundário, a ser implementado futuramente, será responsável pela perfusão da superfície externa da membrana, e contribuirá para uma maior renovação de meio de cultura no interior da câmara de cultura. Tal como acontece com o fluxo primário, a entrada de fluido novo na câmara de cultura aumenta a pressão no seu interior, obrigando à saída do mesmo volume de meio de cultura que entra, e fazendo-o regressar ao reservatório.

A passagem do fluxo primário pelo interior da membrana tubular provoca um efeito de contracção e expansão desta. No entanto, para que tal aconteça, é necessário que exista algum volume de ar no interior da câmara de cultura. A existência de um fluxo secundário poderá auxiliar o ajuste dessa quantidade de ar. É importante frisar que a membrana tubular se deve manter totalmente submersa em meio de cultura durante o decorrer dos ensaios.

## 4.1. Componentes do bio-reactor

### 4.1.1. Câmara de cultura

A câmara de cultura celular é um recipiente que serve para a instalação e condicionamento das membranas tubulares sob condições adequadas. Os requisitos tidos em conta no projecto deste componente do bio-reactor foram os seguintes:

- i. Ser feita de materiais facilmente esterilizáveis;
- ii. Ser de fácil montagem sob condições assépticas;
- iii. Ser hermética, evitando-se o vazamento de meio de cultura por fissuras;

- iv. Ter um volume minimizado, permitindo otimizar-se o gasto de meio de cultura no decorrer de ensaios e ocupando menos espaço no interior da incubadora;
- v. Apresentar uma tampa transparente, de modo a permitir a visualização directa dos ensaios;
- vi. Permitir a instalação de membranas tubulares de vários diâmetros desde 3 mm até 6 mm;
- vii. Permitir uma fácil montagem das membranas tubulares no seu interior;
- viii. Garantir a existência de um fluxo de perfusão primário, que passa pelo interior da membrana tubular. E, futuramente, permitir a existência de um fluxo secundário, que perfunde a membrana externamente;
- ix. Nesta fase, a câmara de cultura poderá estar preparada para acomodar apenas uma membrana tubular em cada ensaio, o que permite uma minimização do consumo de recursos na sua construção.

A primeira ideia foi a de se utilizar um recipiente já existente comercialmente, que pudesse ser adaptado para a concepção da câmara de cultura. Este deveria apresentar alguma transparência, ser hermético, ter uma tampa, ter um volume inferior a 100 mL, ser feito de um material facilmente esterilizável e, caso necessário, maquinável. À partida, esta opção seria a mais adequada para que se evitassem eventuais complexidades da selagem hermética das paredes, do fundo e do topo da câmara. No entanto, dada a dificuldade em encontrar-se um recipiente que cumprisse simultaneamente os requisitos mencionados, optou-se pela construção da câmara de cultura à medida do que se pretendia.

As opções de materiais que surgiram foram: polimetilpentado (PMP), polieterimida (PEI), polipropileno (PP) e policarbonato (PC). Todos estes materiais são facilmente esterilizáveis por autoclavagem. Deu-se preferência à utilização de materiais já disponíveis no Departamento de Física, pelo que o policarbonato foi o material seleccionado. Utilizou-se um varão de 50 mm de diâmetro, a partir do qual se construiu a câmara de cultura e a respectiva tampa. O Policarbonato é um plástico extremamente resistente ao impacto, com boa estabilidade dimensional e autoclavável (a 121 °C, no máximo durante 20 minutos).

O resultado foi uma câmara de cultura com dimensões 90 mm x 44 mm x 30 mm que está preparada para acomodar uma membrana tubular. Esta possui dois furos de 10 mm de diâmetro (furos A e B da Figura 4.2 A), por onde passam os ligadores de fluxo primário. No seu projecto, foi tido em consideração que, futuramente, deverá apresentar dois furos de 4 mm de diâmetro (furos C e D da Figura 4.2 A), sendo um para entrada de fluxo secundário e outro para saída. Os furos C e D foram posicionados de modo a que o fluxo secundário percorra o maior percurso possível entre o orifício de entrada e o de saída. Por isso, o furo D está posicionado na face de trás e próximo da base da câmara e o furo C está na face da frente e próximo do topo.



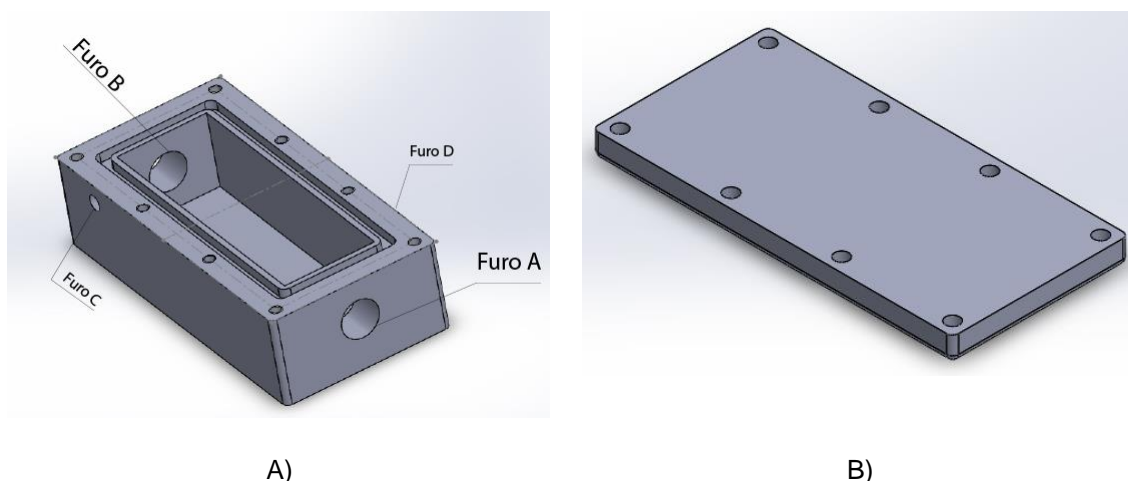


Figura 4.2 Câmara de cultura celular. A) Estrutura; B) Tampa.

Na face de cima, a câmara possui uma cava onde se coloca um *O-Ring* que possibilita a selagem. Quando se pretender fechar a câmara, basta aparafusar-se ao seu topo uma tampa (ver Figura 4.2 B) ).

Os ligadores primários permitem a montagem das membranas tubulares no interior da câmara de cultura. Além da fixação destas, proporcionam a passagem de meio de cultura pelo seu interior, ao servirem de passagem ao fluxo primário do exterior para o interior da câmara e vice-versa. Já os ligadores secundários irão servir para passagem de fluxo secundário.

Cada ligador primário é constituído por duas peças: o ligador externo e o interno (tal como se pode observar no lado esquerdo da Figura 4.3). Cada ligador externo atravessa a parede da câmara de cultura, e liga-se a um tubo de silicone através do qual o meio de cultura entra/sai da câmara. De seguida, já no interior da câmara de cultura, cada ligador externo une-se a um ligador interno, através de um encaixe em forma de disco. Por sua vez, cada ligador interno liga-se a uma das extremidades da membrana tubular. A possibilidade de se ligar o ligador externo a diferentes ligadores internos com vários diâmetros, permite acomodar membranas tubulares de diversos diâmetros (entre 3 mm e 6 mm) no interior da câmara de cultura. Esta é a característica mais inovadora que os ligadores atribuem ao sistema, comparativamente com os bio-reactores analisados que foram desenvolvidos por outros grupos de investigação.

Ambos os ligadores (internos e externos) foram construídos a partir de aço inoxidável. Para se estabelecer o acoplamento entre os ligadores externo e interno foram usadas molas também de aço inoxidável.

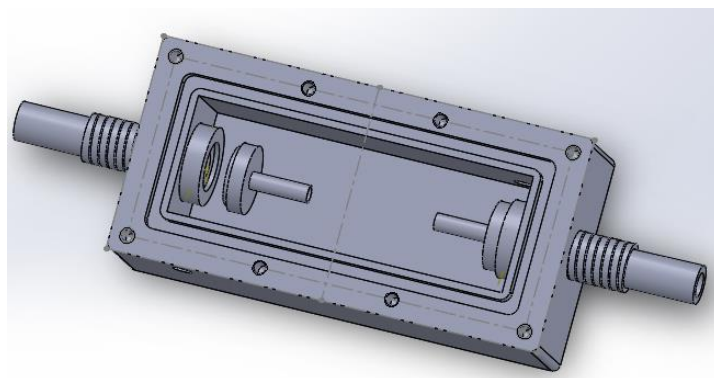


Figura 4.3 Ligadores inseridos na câmara de cultura. No lado esquerdo os ligadores externo e interno encontram-se ainda não unidos. No lado direito pode observar-se o encaixe entre estes.

No projecto dos ligadores primários teve-se em conta que a sua geometria deve proporcionar a passagem de um fluxo laminar pelo interior da membrana. Na junção entre os ligadores interno e externo, devido à transição entre diâmetros, o meio de cultura pode sofrer algumas perturbações. No entanto, assume-se que ao longo do comprimento do ligador interior, de 12 mm de comprimento, o fluxo volta a ser laminar.

Está previsto que dois ligadores secundários estabeleçam a ligação entre os tubos de silicone que transportam o fluxo secundário e o interior da câmara de cultura. Estes irão atravessar os furos C e D da câmara de cultura, pelo que deverão ter 4 mm de diâmetro externo. Prevê-se que sejam colados aos furos com acetona (solvente de policarbonato).

#### **4.1.2. Reservatório de meio de cultura**

Utilizou-se um frasco de vidro esterilizado, de 100 mL de capacidade, como reservatório de meio de cultura. Aquando da montagem do bio-reactor, o frasco foi posicionado no interior da incubadora, pois deste modo o meio de cultura nele contido foi mantido à temperatura (de 37 °C), humidade (de 95 %) e concentração de CO<sub>2</sub> (de 5 %) desejadas.

A tampa do reservatório (ver Figura 4.4) apresenta três furos: dois dos quais são atravessados por tubos passa-muros que se ligam a tubos de silicone para entrada e saída de meio de cultura; e outro para passagem de um tubo que se liga a um filtro com tamanho de poro 0,2 µm. O filtro serve para permitir a ocorrência de trocas gasosas entre o meio de cultura que circula no bio-reactor e o ambiente da incubadora, retendo as impurezas do ar, nomeadamente aquando da entrada de ar na incubadora vindo do exterior.



Figura 4.4 Tampa do reservatório de meio de cultura adaptada para permitir a entrada e saída de meio de cultura e ocorrências de trocas gasosas com a atmosfera da incubadora através de um filtro.

#### 4.1.3. Bomba peristáltica

A bomba peristáltica representada na Figura 4.5 foi utilizada para bombear o fluxo primário do bio-reactor. Em termos de dimensões, apresenta 28 mm de diâmetro e 38 mm de altura. É fácil de desmontar e limpar. Pela cabeça da bomba passa um tubo de 2,5 mm de diâmetro interno e 4,7 mm de diâmetro externo [40]. As restantes especificações técnicas da bomba encontram-se na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 Especificações técnicas da bomba peristáltica. [40]

Especificações técnicas da bomba	
Tensão de alimentação	3 -12 V DC
Peso	89 g
Temperatura de funcionamento	0 °C a + 40 °C
Humidade de funcionamento	< 80 %
Caudal	0 – 100 mL/min
Rotação da bomba	0,1 – 100 rpm
Rotação máxima do Motor	5 000 rpm



Figura 4.5 Bomba peristáltica usada para bombear o meio de cultura pelo interior das membranas tubulares.

Verifica-se que as características da bomba peristáltica são também adequadas ao bombeamento do fluxo secundário (de baixo caudal e de baixa pressão), a implementar futuramente.

#### 4.1.4. Tubos e acessórios

Os tubos de silicone utilizados (referências 350046 e 350069 do catálogo da *Deltalab*) serviram para ligar os vários componentes do sistema. Foram utilizados tubos com dimensões 6x9 mm em todo o circuito, excepto nas ligações aos sensores de pressão, em que foram aplicados tubos 4x6 mm. Os tubos de silicone utilizados são translúcidos, atóxicos, apresentam uma alta resistência química e mecânica, e podem ser utilizados a temperaturas desde -50 °C até 200 °C.

Os acessórios que conectam os tubos vieram do fornecedor *Deltalab* da *LaborSpirit*, e foram os seguintes: Conectores T para tubos de 6 mm (ref.<sup>a</sup> 19460) e 8 mm (ref.<sup>a</sup> 19461); Conectores Y para tubos de 6 mm (ref.<sup>a</sup> 19465); E conectores rectos para tubos de 4/5/6 mm (ref.<sup>a</sup> 19434) e 6/7/8 mm (ref.<sup>a</sup> 19435). Todos estes acessórios são de polipropileno e autoclaváveis.

#### 4.1.5. Sensores de pressão

No circuito do bio-reactor foram instalados dois sensores de pressão: um à entrada e outro à saída da câmara de cultura. Desta forma, pode-se obter informação sobre a queda de pressão que ocorre neste elemento. A membrana tubular está posicionada, aproximadamente, a igual distância dos dois sensores. Logo, pode considerar-se que o valor médio dos valores de pressão registados à entrada e à saída da câmara de cultura corresponde à pressão na membrana.

Os sensores de pressão utilizados (ver fotografia na Figura 4.6 A) ) são do fabricante *Honeywell* (referência 26PCBFA1G) e dispõem de um diafragma de silício. O modelo escolhido foi o de leitura diferencial, que lê duas fontes de pressão independentes simultaneamente. Neste caso, foi lido o valor de pressão à entrada/saída da câmara de cultura em comparação com a pressão atmosférica. Os sensores têm um intervalo de medida de 0 a 5 psi, ou seja, de 0 a aproximadamente 259 mmHg. Assim, a sua gama de pressão satisfaz as necessidades do bio-reactor em causa, no qual se pretende aplicar um valor máximo de pressão de 150 mmHg às membranas tubulares. As restantes especificações técnicas dos sensores estão resumidas na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 Características técnicas dos sensores de pressão.

Características técnicas	
Tensão de alimentação	10 V DC
Precisão	± 0,25 %
Temperatura de funcionamento	- 40 °C a + 85 °C
Tempo de resposta	1 ms
Saída analógica	47 mV → 53 mV
Tipo de saída	Não amplificada
Sensibilidade ( mV/(psi x 10 V) )	10 mV

O funcionamento dos sensores de pressão baseia-se no conceito de piezoresistividade e numa montagem em ponte de *Wheatstone* (ver Figura 4.6 B) integrada no próprio sensor. A ponte está equilibrada, ou seja, todas as quatro resistências têm o mesmo valor, pelo que qualquer variação de resistência numa ou mais resistências da ponte provocará uma diferença de potencial  $V_0$  diferente de zero. Assim, a ponte de *Wheatstone* converte essa variação de resistência numa tensão de saída na ordem dos, tipicamente, milivolts.

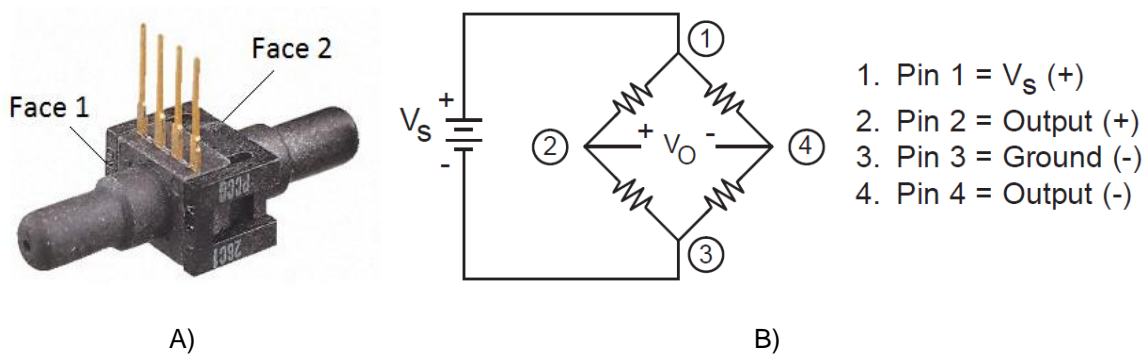


Figura 4.6 A) Sensor de pressão diferencial; B) Esquema interno do sensor e dos seus terminais.

Os terminais do sensor de pressão à entrada da câmara de cultura foram ligados a um cabo de cor preta. Já os terminais do sensor de pressão à saída da câmara de cultura foram ligados a um cabo de cor branca (a correspondência entre fios encontra-se indicada na Tabela 4-3). Ambos os cabos se ligam às fichas de um outro cabo, de cor cinzenta, que por sua vez estabelece a ligação com a placa de circuito impresso. A correspondência entre os sinais e os fios do cabo de cor cinzenta encontra-se descrita na Tabela 4-4.

Tabela 4-3 Correspondência entre os terminais de ambos os sensores de pressão e os fios dos cabos de cor preta e de cor branca.

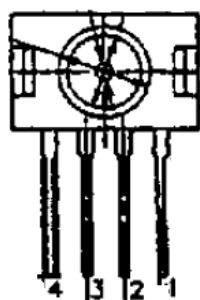
Terminal do sensor de pressão	Fio do cabo preto	Fio do cabo branco
1 - $V_s$ (+)	Azul	Preto
2 - Saída (+)	Vermelho	Amarelo
3 - Terra (-)	Amarelo	Vermelho
4 - Saída (-)	Branco	Verde

Tabela 4-4 Correspondência entre os sinais e os fios do cabo de cor cinzenta.

Sinal	Fio do cabo cinzento
$V_s$ (+)	Rosa
Terra (-)	Amarelo
Saída (+) sensor entrada	Castanho
Saída (-) sensor entrada	Branco
Saída (+) sensor saída	Cinzento
Saída (-) sensor saída	Verde

Quanto aos terminais dos sensores, o terminal 1 é o que apresenta uma pequena fenda. Na vista com a face 2 do sensor (que é a face mais afastada dos terminais – ver Figura 4.7 A) virada para a frente, o terminal 1 é o que se encontra mais à direita (ver Figura 4.7 A) ). O terminal 2 é o seguinte, etc.

O sensor de pressão à entrada da câmara de cultura deve ser inserido no cabo de cor preta de modo a que a face 2 fique mais à frente em relação à face do cabo que tem uma marca na manga termo-retráctil (ver Figura 4.7 B) ). A inserção do sensor posicionado à saída da câmara de cultura no cabo de cor branca é feita da mesma forma.



A)



B)

Figura 4.7 A) Desenho de identificação dos terminais do sensor de pressão; B) Fotografia que mostra a correcta inserção dos sensores de pressão no cabo.

#### 4.1.5.1 Amplificação do sinal de pressão

Tendo em conta que a diferença de tensão entre as saídas dos sensores se encontra na ordem dos mV, foi necessário efectuar-se a amplificação do sinal de modo a usar toda a resolução do conversor analógico-digital do microcontrolador. Os circuitos de amplificação dos sinais de saída dos sensores de pressão foram implementados numa placa de circuito impresso (PCB – *Printed Circuit Board* - ver esquema da Figura 4.8).

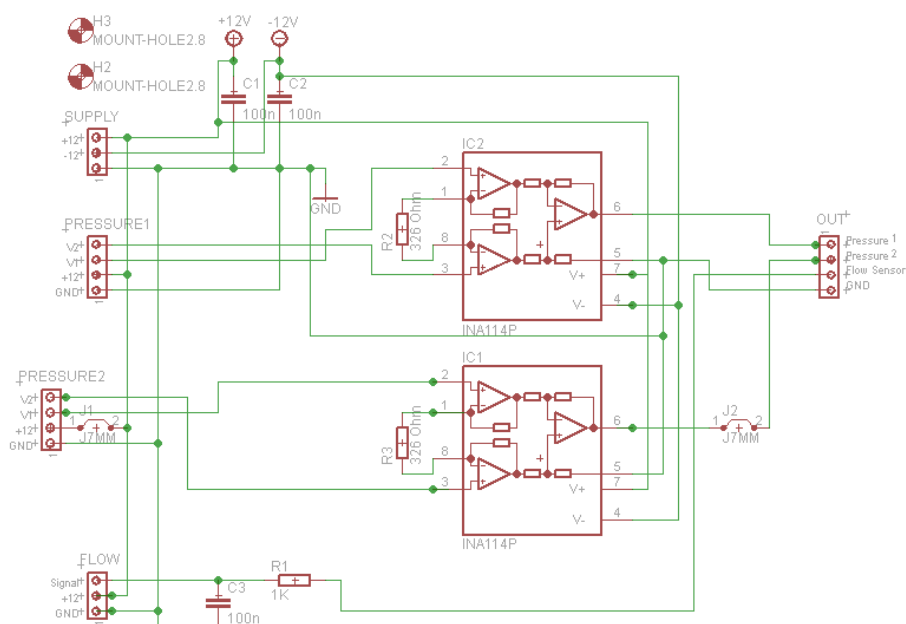


Figura 4.8 Esquema do circuito da placa de circuito impresso implementado em software Eagle.

Foram utilizados dois amplificadores de instrumentação INA 114AP (8-pin PLASTIC), que apresentam uma excelente precisão. As principais características técnicas deste tipo de amplificador encontram-se resumidas na Tabela 4-5. O seu pequeno tamanho torna-os ideais para um vasto conjunto de aplicações, inclusivamente em instrumentação médica. Cada um é constituído por três amplificadores operacionais, dois dos quais amplificam individualmente cada um dos sinais vindos do sensor de pressão, e o outro amplifica a diferença entre esses dois sinais.

Tabela 4-5 Características técnicas do amplificador de instrumentação INA 114AP.

Características técnicas	Valor
Alcance de temperatura	- 40 °C a + 85 °C
Alcance do Ganho	0 a 10 000
Protecção contra sobretensão de entrada	± 40V
Tensão de alimentação	± 2,25 a ± 18V (Típica: ± 15V)
Tensão de <i>offset</i>	50 µV max.
Derivação	0,25 µV/°C max.
Corrente de repouso	3 mA max.
Corrente de entrada de polarização	2 nA max.
Rejeição de modo comum	115 dB min (para G = 1000)

O valor das resistências  $R_2$  e  $R_3$  dos circuitos de amplificação dos sensores de pressão (ver Figura 4.8) foi calculado tendo em conta o valor máximo de pressão que se pretendia aplicar às membranas tubulares no bio-reactor, que era de 150 mmHg. A tensão de saída do sensor de pressão é não-amplificada e, de acordo com o fabricante, pode variar bastante de sensor para sensor. Houve assim necessidade de assumir que o valor correspondente à leitura máxima da pressão, ou seja, 5 psi (aproximadamente 258,6 mmHg) seria de 53 mV.

Então, 150 mmHg corresponde a uma tensão de saída:  $\frac{53 \text{ mV} \times 150 \text{ mmHg}}{258,6 \text{ mmHg}} \cong 30,74 \text{ mV}$ .

Pretendia-se submeter o sinal a uma amplificação com ganho  $G$ , tal que 150 mmHg correspondesse a 5 V numa escala de 0 V a 5 V (gama do sinal de entrada nos conversores analógico-digitais do microcontrolador). Logo vem:

$$30,74 \text{ mV} \times G = 5 \text{ V} \Leftrightarrow G \cong 163$$

A expressão do ganho para o amplificador INA114 é a seguinte:

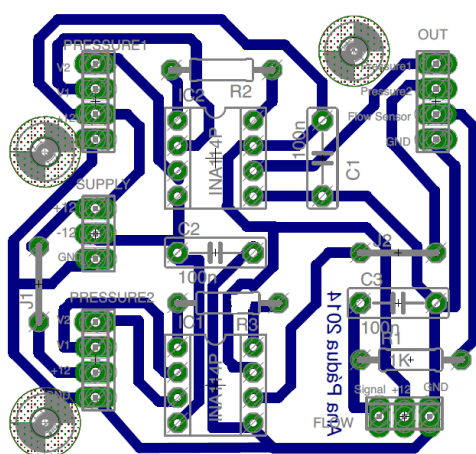
$$G = 1 + \frac{50 \text{ k}\Omega}{R_G}$$

Determinando-se o valor da resistência  $R_G$  através da expressão para um ganho  $G = 163$ :

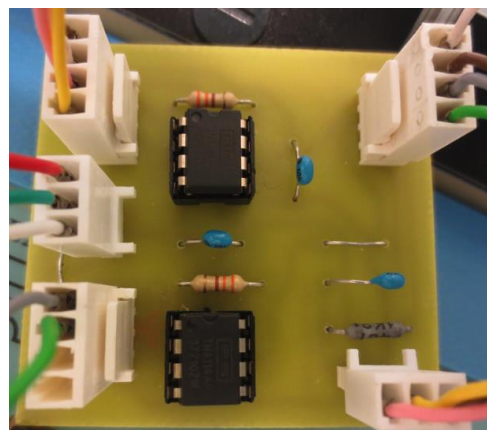
$$G = 1 + \frac{50 \text{ k}\Omega}{R_G} \Leftrightarrow 163 = 1 + \frac{50 \text{ k}\Omega}{R_G} \Leftrightarrow R_G = \frac{50 \text{ k}\Omega}{162} \Leftrightarrow R_G \cong 309 \Omega$$

Utilizou-se uma resistência de 326  $\Omega$ . Assim sendo, o ganho foi de, aproximadamente, 154.

A placa de circuito impresso (ver Figura 4.9) recebe as tensões de alimentação (positiva, negativa e *Ground*) fornecidas pela mesa de sinais, e encarrega-se de fazê-las chegar até aos amplificadores de instrumentação e aos sensores. Apresenta dois circuitos de amplificação, que têm como função amplificar os sinais de saída dos sensores de pressão. Permite ainda receber o sinal de saída do sensor de caudal. A resistência  $R_1$  serve para protecção dos circuitos, limitando a corrente no caso de haver alguma avaria do sensor de caudal ou do circuito do microcontrolador. Os condensadores C1 e C2 servem para filtrar as tensões de alimentação dos amplificadores de instrumentação. Os sinais de saída dos sensores de pressão amplificados, o sinal de saída do sensor de caudal e o *Ground* estão disponíveis numa ficha para serem depois ligados aos respectivos terminais do microcontrolador.



A)



B)

Figura 4.9 Placa de circuito impresso do bio-reactor. A) Desenho e esquema de montagem dos componentes à escala 1:1; B) Imagem da placa com os componentes já soldados.



#### 4.1.5.2 Calibração das medidas de pressão

A calibração das medidas de pressão foi efectuada com recurso a um esfigmomanómetro de mercúrio e a um multímetro. Para cada um dos sensores, a cada subida de 10 mmHg na escala do esfigmomanómetro registou-se a tensão obtida (em Volt). Esta tensão corresponde ao sinal de saída do sensor após sofrer uma amplificação com ganho de 154. As rectas de calibração obtidas, assim como as respectivas equações, encontram-se nos gráficos da Figura 4.10 (correspondente ao sensor posicionado à entrada da câmara de cultura) e da Figura 4.11 (correspondente ao sensor posicionado à saída da câmara de cultura).

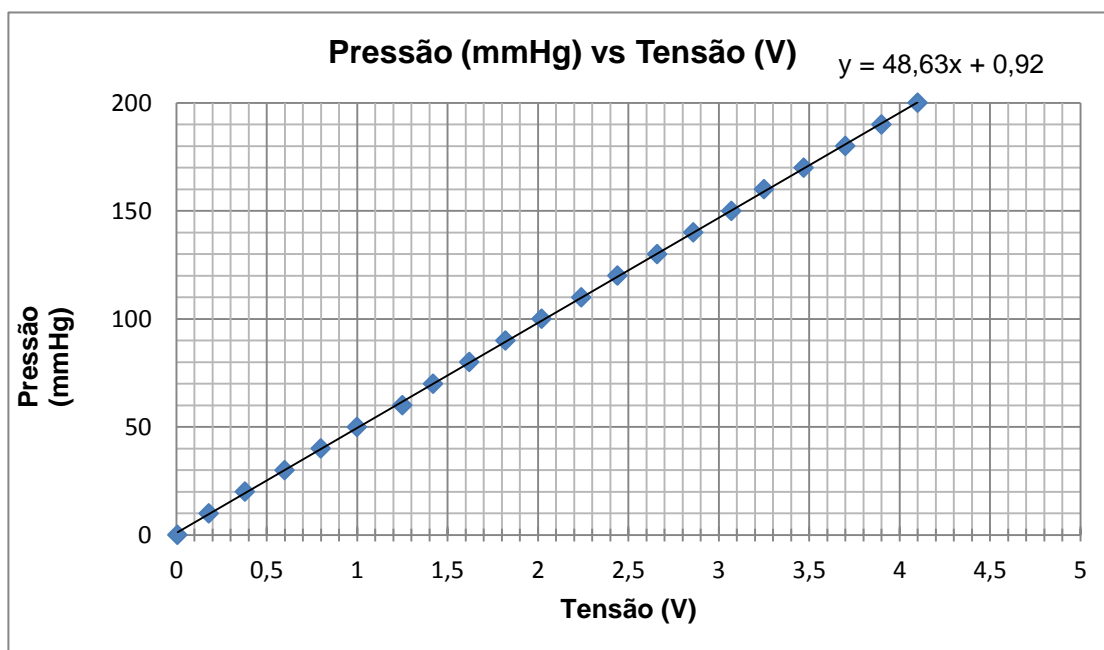


Figura 4.10 Recta de calibração do sensor de pressão posicionado à entrada da câmara de cultura.

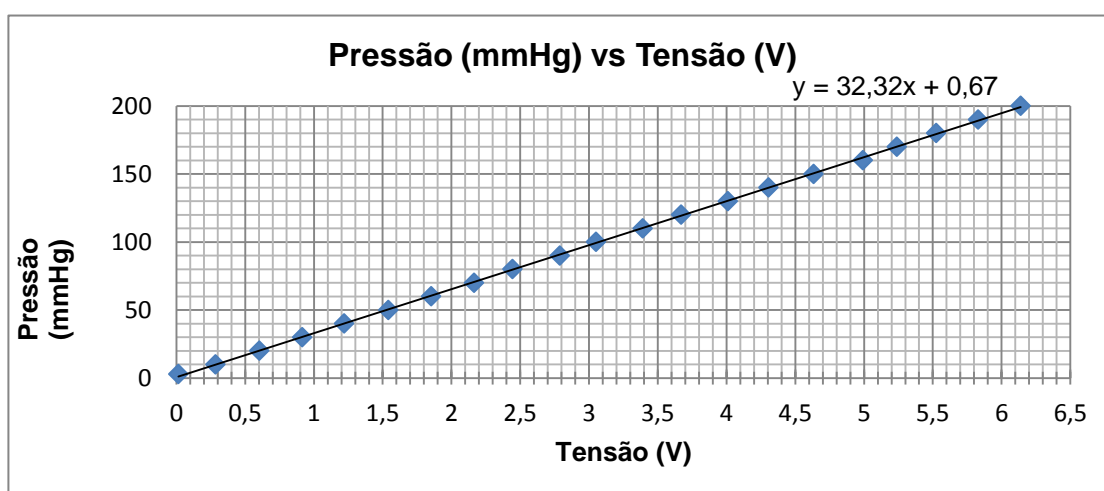


Figura 4.11 Recta de calibração do sensor de pressão posicionado à saída da câmara de cultura.

Atendendo a que o sinal sofreu uma amplificação de ganho 154, e a que o declive da recta de calibração (m) do sensor à saída da câmara de cultura é 32,32 mmHg, e sabendo que 1 psi  $\cong$  51,71 mmHg é possível medir-se experimentalmente a sensibilidade do sensor, isto é:

$$\frac{\frac{1}{\text{Amplificação}} (V)}{\text{Declive da recta (mmHg)}} = \frac{\frac{1}{154} (V)}{32,32 (mmHg)} = \frac{\frac{1}{154} (V)}{\frac{32,32}{51,71} (psi)} \cong 10,4 \frac{mV}{psi}$$

Este valor é coerente em relação ao valor teórico apresentado na *datasheet* do sensor de pressão (10 mV/psi).

#### 4.1.6. Sensor de caudal

Inicialmente foi utilizado um sensor de caudal com um intervalo de medição desde 50 mL/min até 10 L/min. Com o intuito de se medir o caudal aplicado no bio-reactor foram realizadas experiências iniciais, com uma bomba peristáltica da marca WATSON MARLOW, que tem capacidade para bombear caudais desde 0,01 mL/min até 1750 mL/min. Com esta bomba, a aquisição de medidas de caudal foi possível. No entanto, mesmo para valores mínimos de tensão de alimentação eléctrica da bomba, as pressões registadas eram superiores a 200 mmHg, ou seja, encontravam-se acima dos valores que se pretendia aplicar no bio-reactor. Por este motivo, a bomba foi trocada por outra com capacidade para gerar pressões mais baixas. A nova bomba, cujas características são apresentadas na Secção 4.1.3 - Bomba peristáltica, foi capaz de gerar os pulsos de pressão desejados. Mas, para os valores de pressão que se pretendia aplicar, o caudal máximo gerado pela bomba era inferior a 50 mL/min (mínimo do intervalo de medição do sensor de caudal que estava a ser utilizado).

Visto que o sensor de caudal disponível não conseguia ser útil na medição do caudal gerado pela nova bomba peristáltica adoptada, houve necessidade de se conhecer o caudal bombeado de outra forma. Realizou-se um ensaio, em que se registou o volume de fluido bombeado para uma proveta por minuto. Os valores obtidos em função da tensão de alimentação eléctrica da bomba encontram-se na Tabela 4-6.

Tabela 4-6 Caudal (mL/min) em função da tensão de alimentação eléctrica da bomba.

Tensão de alimentação eléctrica da bomba (V)	Caudal (mL/min)
3,5	15
4,0	19
4,5	22
5,0	24
5,5	29
6,0	31
6,5	34
7	37
7,5	45

De forma a conseguir-se obter medições com o fluido em contante circulação foi encomendado um sensor adequado para medir baixos caudais, do modelo FCH-m-POM-HD da B.I.O-TECH. Este sensor tem um intervalo de leitura desde 2 mL/min até 100 mL/min. O seu princípio de medição baseia-se no uso de uma turbina, em que as pás se movimentam com a passagem de fluido pelo interior do sensor. O fluido apenas entra em contacto com o corpo do sensor e a turbina, ambos feitos de materiais biocompatíveis.

O sinal de saída gerado é uma onda quadrada com dois estados, 0 V e 5 V, cuja frequência depende da velocidade de rotação das pás. O sensor vem calibrado por forma a que a passagem de um litro de fluido produz cerca de 17 000 pulsos. Assim, contando o número de pulsos e o tempo decorrido entre eles pode-se saber o volume de fluido que passou pelo sensor num determinado intervalo de tempo (caudal). O sinal de saída do sensor de caudal é filtrado na placa de circuito impresso e segue depois para uma entrada digital do microcontrolador.

Neste caso, o circuito do bio-reactor apresenta igual caudal em qualquer ponto. Por isso, e de forma a minimizar-se os elementos no interior da incubadora, optou-se por posicionar o sensor de caudal no exterior da incubadora, à saída da bomba peristáltica.

#### **4.1.7. Programação do microcontrolador**

A função do microcontrolador é a de permitir a aquisição dos dados de pressão e caudal e comunicá-los ao computador através duma ligação série USB. A escolha recaiu sobre um microcontrolador *Atmel* montado numa placa de uso livre (*open-source*) Arduino Uno fabricada pela empresa *Smart Projects*.

A programação (em linguagem C) específica do Arduino dispõe de duas funções: *setup()* e *loop()*. A função *setup()* é executada uma única vez, quando é ligada a alimentação eléctrica. É nesta função que é feita a configuração do microcontrolador, nomeadamente definindo qual a taxa de transmissão de dados a usar na comunicação série, que terminais digitais se pretende usar como entradas e como saídas, entre outros.

A função *loop()* é um ciclo em que o código é executado em interacções consecutivas e foi programado para nunca ser interrompido. É nesta função que são desenvolvidos os algoritmos para aquisição dos sinais analógicos de pressão e do sinal digital do caudal.

No ciclo *loop()* foi integrada a função *frequency()* que lê o sinal digital de saída do sensor de caudal, e que converte os pulsos (HIGH ou LOW) enviados por este num valor de frequência média de pulsos por unidade de tempo. Posteriormente, o valor de frequência média obtido pode ser convertido em mL/min, atendendo à calibração do sensor.

O conversor analógico-digital do microcontrolador tem uma resolução de 10 bits, pelo que converte sinais no intervalo 0 V a 5 V num número entre 0 e 1023, o que dá uma resolução em tensão de aproximadamente 5 mV.

A Tabela 4-7 mostra as ligações que é necessário fazer entre a placa de circuito impresso e o microcontrolador.

Tabela 4-7 Correspondência entre os terminais de entrada do microcontrolador e os sinais dos sensores.

Terminal do Arduino	Sensor
D3	Caudal
A1	Pressão à entrada da câmara de cultura
A2	Pressão à saída da câmara de cultura

Os valores de pressão e caudal são comunicados ao computador através de um conjunto de comandos que se desenvolveu para o efeito. Por exemplo, para comunicar um valor de pressão à entrada e à saída da câmara de cultura, o microcontrolador formata esta informação no comando "P27#3%", em que "P" dá a indicação que o valor é de pressão, "27" é o valor da pressão à entrada da câmara, "#" é o caractere que separa o valor que é identificado como pressão à entrada do valor que é identificado como pressão à saída, "3" é o valor da pressão à saída da câmara de cultura e "%" é um caractere escolhido como indicador de terminação do comando.

O microcontrolador foi programado para funcionar em modo *slave*, ou seja, só efectua uma leitura se receber uma indicação do computador para o fazer. Ao receber essa indicação o microcontrolador desencadeia as acções necessárias para adquirir os dados e comunicá-los de seguida ao computador.

Os comandos que foram desenvolvidos para que o microcontrolador possa reconhecer e interpretar as indicações do computador são, por exemplo, do tipo "P1%", em que "P" é uma indicação para que o microcontrolador faça uma leitura de pressão, "1" indica que a pressão a medir é referente ao sensor à entrada da câmara de cultura e "%" é novamente um caractere para indicar a terminação do comando.

#### 4.1.8. Programa de aquisição de dados

Foi desenvolvido um programa em ambiente LabVIEW 2012 da *National Instruments* que se baseou na adaptação de uma outra aplicação informática já existente no grupo de Engenharia de Tecidos.

A interface do programa possibilita a visualização numérica e gráfica da pressão (à entrada e/ou à saída da câmara de cultura) e do caudal que circula no bio-reactor. Caso o utilizador assim o deseje, é possível guardar os dados de pressão e de caudal adquiridos num ficheiro que pode ser lido em *Excel*.

Tal como se pode observar na Figura 4.12:

Em A é possível seleccionar os canais que estão ligados ou desligados e as respectivas taxas de aquisição por segundo.

Em B, o botão permite definir os parâmetros de configuração do porto série. É possível seleccionar-se o porto a que se pretende ligar o cabo de interligação, a taxa de transmissão (definida para 9600 bits/s, por norma), entre outros parâmetros.

Em C é exibido o gráfico de pressão e em D é mostrado o gráfico de caudal, ambos em função do tempo de aquisição. O gráfico de pressão apresenta a pressão à entrada e/ou à saída da câmara de cultura, consoante os canais activos. Por exemplo, quando os canais “Pressão” e “Entrada” estão activos, é apresentado o gráfico de pressão à entrada da câmara de cultura. Caso os canais seleccionados sejam “Pressão” e “Saída”, é exibido o gráfico de pressão à saída da câmara de cultura. Caso ambos os canais de pressão estejam activos, mostra também o gráfico de pressão média (correspondente à média das pressões à entrada e à saída da câmara de cultura), tal como se pode observar na Figura 4.12.

Em I, são mostrados os valores de pressão e caudal que estão a ser medidos em cada iteração.

Em E, o botão “Iniciar/Terminar” permite começar ou terminar a aquisição dos sinais. Quando a aquisição está a decorrer o LED vermelho permanece aceso. Caso contrário, o LED fica apagado.

Na secção F é indicado há quanto tempo a aquisição está a decorrer, e também é possível definir a duração da aquisição.

Já na secção G, pressionando o botão “Gravar dados”, os valores medidos desde o início da execução do programa são guardados num ficheiro, possível de ser aberto em Excel. Neste documento consta informação sobre o tempo a que foi feita cada aquisição, os valores de caudal e de pressão medidos, bem como a data e hora da gravação.

Em H, pressionando o botão “Sair”, o programa termina a execução.

Durante o desenvolvimento da aplicação informática considerou-se conveniente poder-se fazer testes do sistema com várias taxas de aquisição de dados, pelo que esta possibilidade está também disponível na interface.

Os vários testes efectuados permitiram usar taxas na ordem das 50 aquisições por segundo em cada canal. Porém o algoritmo para determinação do caudal é lento, ou seja, é necessário esperar um tempo máximo por um pulso do sensor (na ordem de um segundo), pelo que os valores do caudal podem perfeitamente ser adquiridos a uma taxa de uma única aquisição por segundo.

Na prática usaram-se taxas de 40 aquisições por segundo com os sensores de pressão, que se revelaram suficientes.

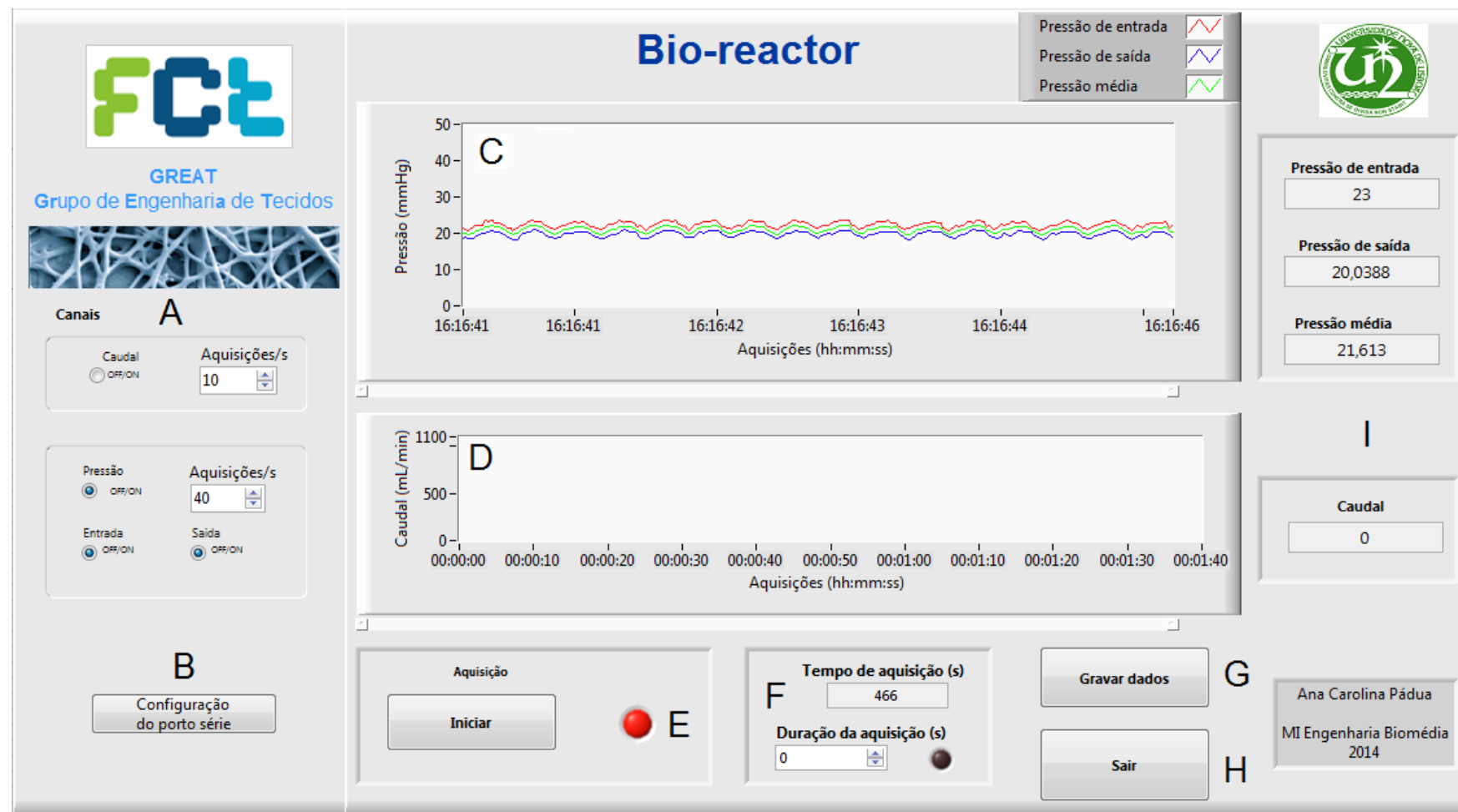


Figura 4.12 Pannel Frontal do LabVIEW, em modo de apresentação dos gráficos de pressão (em mmHg) à entrada da câmara de cultura (linha vermelha), à saída da câmara de cultura (linha azul) e da média entre as pressões à entrada e à saída da câmara de cultura (linha verde) em função do tempo de aquisição (em hh:mm:ss). Os canais seleccionados foram “Pressão”, “Entrada” e “Saída”.

## 4.2. Ligação do bio-reactor à incubadora

A incubadora (modelo MCO-19AIC CO<sub>2</sub> (UV) da SANYO) possui um orifício de acesso ao exterior. Este é fechado por uma tampa, que foi adaptada para passagem de cabos e tubos (ver Figura 4.13). Visto que a área da tampa é limitada, foi necessário minimizar-se o número de cabos e tubos que a perfuram, assim como os respectivos diâmetros. Fez-se atravessar pela tampa:

- A. Um cabo de seis condutores, que conduz as tensões de alimentação até aos sensores de pressão (no interior) e os sinais de saída dos sensores de pressão até à placa de circuito impresso (no exterior).
- B. Dois tubos construídos a partir de duas pipetas plásticas, tipicamente usadas em cultura celular, com diâmetro externo de 6 mm. Ambas as extremidades de cada uma estabelecem ligação com tubos de silicone 6x9 mm. Uma das pipetas permite o transporte de fluido do interior para o exterior da incubadora, e a outra permite o transporte de fluido do exterior para o interior.

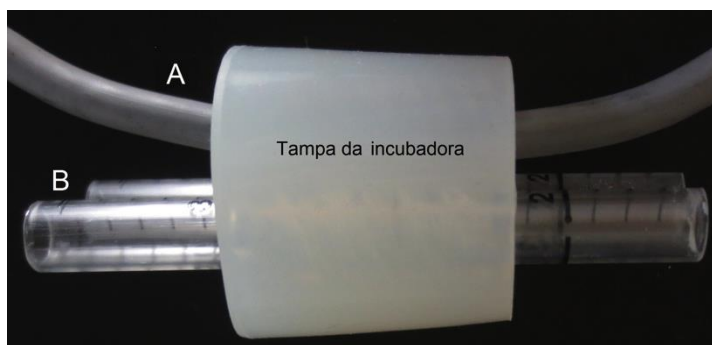


Figura 4.13 Tampa da incubadora. A – Cabo de seis condutores; B – Tubos com diâmetro externo de 6 mm.

## 4.3. Ensaios de citotoxicidade aos materiais do bio-reactor

Foram efectuados ensaios de citotoxicidade a fim de se garantir que todos os materiais que entram em contacto com o meio de cultura que circula no bio-reactor são não-citotóxicos. Utilizou-se um método indirecto, que consistiu em submergir cada um dos componentes que constitui o bio-reactor em meio de cultura. Caso algum dos materiais libertasse algum lixiviado citotóxico para o meio de cultura, tal reflectir-se-ia nos resultados de viabilidade celular.

Todos os materiais foram submetidos a um processo de limpeza que incluiu um banho de ultrasons (no equipamento *Digital Heated Ultrasonic Cleaner UD100SH-3L*) a 50 °C durante 20 minutos. Posteriormente foram esterilizados com isopropanol numa câmara de fluxo laminar (*LabCulture* da *ESCO*). Após a esterilização, os componentes foram imersos num tubo Falcon com cerca de 3 mL de meio de cultura. A imersão durou cinco dias numa incubadora a 37 °C. Após este período, o meio de cultura condicionado pelos vários materiais foi recolhido para ser analisado por ensaios de citotoxicidade.

Simultaneamente com o condicionamento dos materiais foi efectuada uma sementeira de células Vero (linhagem isolada de células epiteliais de rim de macaco verde Africano) em 27 dos poços de uma placa de 48. O protocolo seguido incluiu a preparação de uma suspensão celular e a determinação da concentração de células aí presentes. Depois calculou-se o volume de meio de cultura que lhe seria adicionado, de modo a que se obtivesse uma solução com o volume desejado e que contivesse o número total de células que se pretendia semear.

Segundo a experiência do Grupo de Engenharia de Tecidos, se forem semeadas 10 000 células por poço numa placa de 24 poços obtém-se confluência celular após cerca de quatro dias. Sabe-se que, numa placa de 24 poços, o raio de cada poço é 8 mm e que, numa placa de 48 poços, cada poço tem 6 mm de raio. Logo, o número de células a semear em cada poço de uma placa de 48 poços é dado por:

$$\frac{\text{Área de um poço da placa de 48 poços} \times 10\,000 \text{ células}}{\text{Área de um poço da placa de 24 poços}} = \frac{\pi \times 6^2 \times 10\,000}{\pi \times 8^2} \approx 5600 \text{ células}$$

Por aproximação ao resultado obtido, foram semeadas 5 000 células em cada poço da placa de 48 poços. O volume de meio de cultura adicionado a cada poço foi de 500 µL.

Vinte e quatro horas após o início da sementeira de células renovou-se o meio de cultura dos poços correspondentes ao controlo negativo e ao controlo positivo, adicionou-se 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO - *Dimethyl sulfoxide*) aos poços correspondentes ao controlo positivo e substituiu-se o meio de cultura dos restantes poços por meio de cultura que tinha sido condicionado durante 5 dias com cada um dos materiais constituintes do bio-reactor.

No dia seguinte, a placa de poços foi observada no microscópio invertido com contraste de fase (*Nikon Eclipse Ti-S*), tendo-se constatado que as células que foram semeadas nos poços correspondentes ao controlo positivo e ao meio de cultura condicionado pelas anilhas do bio-reactor apresentavam uma morfologia redonda e encontravam-se em suspensão, estando na sua maioria inviáveis. Os restantes poços apresentavam células alongadas e aderidas, o que indicava que estariam viáveis.

De modo a quantificar-se a viabilidade celular foi realizado um teste utilizando-se resazurina como indicador do número de células viáveis. A resazurina é um composto azul (com um pico de absorvância de radiação com um comprimento de onda de cerca de 600 nm) que é irreversivelmente convertido em resorufina (composto vermelho, com um pico de absorvância de radiação com um comprimento de onda de cerca de 570 nm), através de uma reacção de oxidação-redução, que ocorre nas mitocôndrias de células viáveis. Assim, dentro de certos limites, a conversão de resazurina em resorufina é proporcional ao número de células metabolicamente activas.

A avaliação da resazurina convertida em resorufina seguiu um protocolo que teve início com a substituição do meio de cultura de todos os poços da placa de 48 poços por uma solução com uma mistura de 500 µL de meio de cultura fresco com 50 µL de resazurina. A Figura 4.14 A) ilustra a cor azul escura dos poços aos quais foi adicionada uma solução de meio de cultura com 10 % de resazurina.

Após um período de quatro horas na incubadora, observou-se a placa de 48 poços, tendo-se verificando que os poços correspondentes às réplicas de controlo positivo, de controlo de meio



e de meio de cultura condicionado pelas anilhas apresentavam uma tonalidade azul escura. Já os restantes poços apresentavam uma tonalidade mais arroxeada, semelhante à do controlo negativo. As diferenças de cor observadas encontram-se ilustradas na Figura 4.14 B).

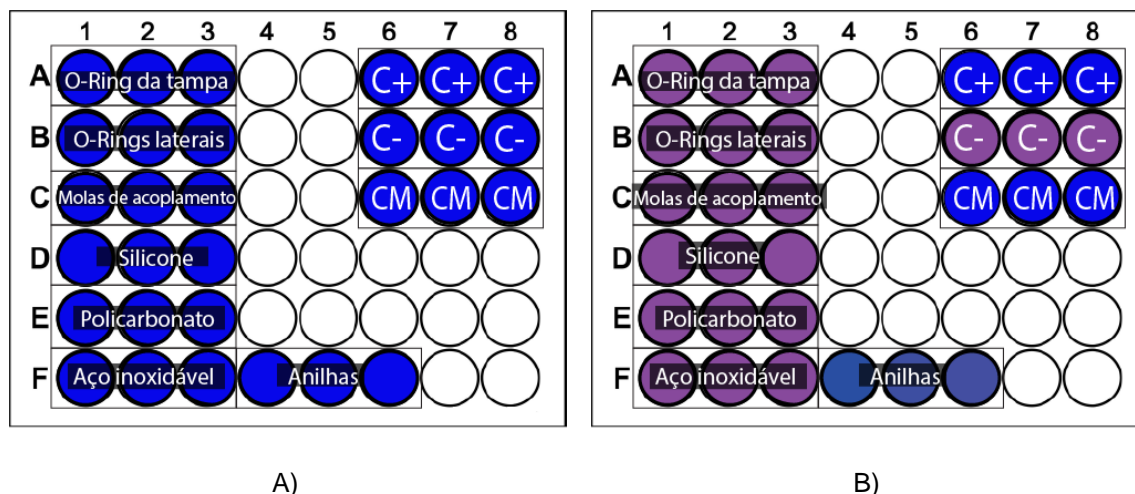


Figura 4.14 Ilustração da placa de 48 poços, utilizada no ensaio de citotoxicidade. A) Immediatamente após a adição de meio de cultura com 10 % de resazurina a cada um dos poços da placa; B) Após quatro horas de incubação com resazurina. C+: Controlo Positivo; C-: Controlo Negativo; CM: Controlo de Meio.

De seguida, transferiu-se o conteúdo de cada um dos poços da placa de 48 poços para uma placa de 96 poços. No total obtiveram-se 6 réplicas para cada material e para cada controlo. Finalmente foram lidas as absorvâncias do meio de cultura dos poços a 570 nm e a 600 nm.

Após a análise e o tratamento dos dados obtidos verificou-se que, em média, as células semeadas com meio de cultura que tinha estado incubado com os materiais do bio-reactor (excepto as anilhas) apresentaram uma viabilidade superior a 95 %, em relação ao controlo negativo. Porém, as células semeadas com meio de cultura condicionado pelas anilhas apresentaram uma viabilidade de apenas 25 %. Estes resultados indicam que, de todos os materiais testados, apenas as anilhas são citotóxicas. Desta forma, mostrou-se que os *O-Rings* de viton (usados na tampa e nos suportes externos), as molas de acoplamento, os tubos de silicone, a câmara de cultura em policarbonato e os ligadores em aço inoxidável são seguros para a cultura celular. Já as anilhas, que tinham sido produzidas a partir de um material desconhecido, foram substituídas por anilhas de Teflon. O Teflon é um material garantidamente não-citotóxico, pois já é comumente utilizado em culturas celulares no seio do Grupo de Engenharia de Tecidos.

Não foi necessário efectuar testes à citotoxicidade dos acessórios para tubos utilizados, devido à garantia por parte do fabricante de que são feitos de polipropileno, um material biocompatível.

Através deste ensaio foi possível assegurar que todos os materiais constituintes do bio-reactor que entram em contacto com o meio de cultura circulante são não-citotóxicos.

#### 4.4. Testes do sistema de monitorização da pressão

Foram realizadas experiências que mostraram que o uso da bomba peristáltica no circuito do bio-reactor por si só, ou seja, sem qualquer válvula adicionada, resulta na aplicação de uma pressão média de 12 mmHg às membranas tubulares. Nestas condições, a amplitude de onda de pressão máxima conseguida foi de aproximadamente 5 mmHg.

A utilização de uma válvula que permite controlar a pressão mecânica por estrangulamento de um tubo, permitiu o ajuste da pressão para valores desde 15 mmHg até mais de 150 mmHg. Assim, atribuindo-se uma resistência adicional ao circuito, conseguiram-se regular os valores de pressão no bio-reactor. A Figura 4.15 mostra o gráfico da pressão à entrada da câmara de cultura e a Figura 4.16 apresenta o gráfico de pressão à saída da câmara de cultura, por ajuste da válvula. Na Figura 4.12, em C, é apresentado o gráfico das pressões registadas à entrada e à saída da câmara de cultura bem como a pressão média entre estas.

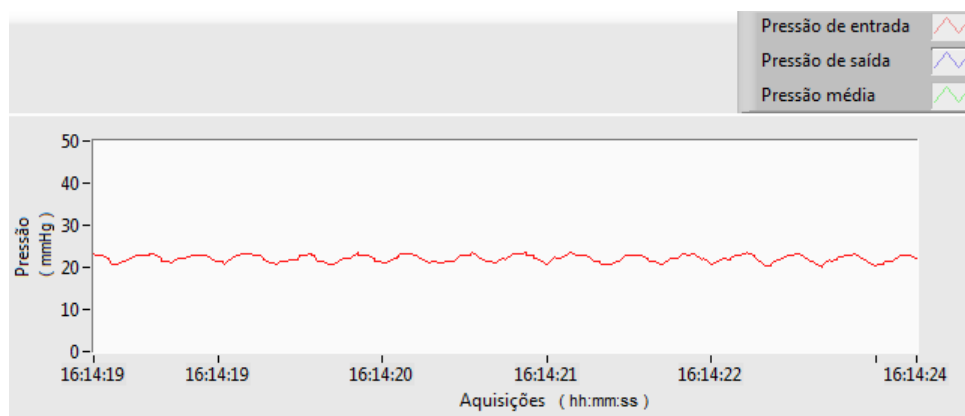


Figura 4.15 Gráfico de pressão à entrada da câmara de cultura (mmHg) em função do tempo (hh:mm:ss), com a bomba peristáltica em funcionamento e por ajuste de uma válvula. Tensão de alimentação da bomba: 3 V.

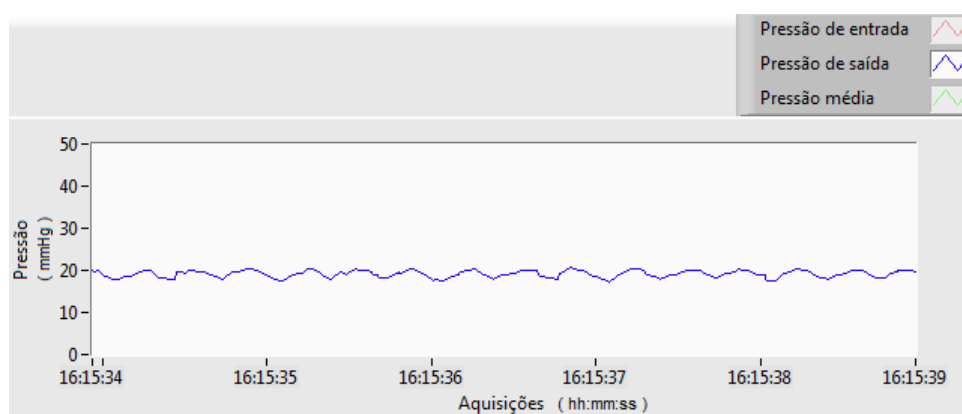


Figura 4.16 Gráfico de pressão à saída da câmara de cultura (mmHg) em função do tempo (hh:mm:ss), com a bomba peristáltica em funcionamento e por ajuste de uma válvula. Tensão de alimentação da bomba: 3 V.

## 4.5. Testes ao bio-reactor

Foram realizados testes de fiabilidade ao sistema, que permitiram assegurar que não ocorria vazamento no circuito, e que as ligações electrónicas estabelecidas funcionavam para a monitorização da pressão.

Em primeiro lugar procedeu-se à limpeza e à esterilização de todos os elementos constituintes do bio-reactor, de acordo com o protocolo descrito no Apêndice C . Depois procedeu-se à montagem do bio-reactor na câmara de fluxo laminar, segundo o procedimento apresentado no Apêndice D . Após a montagem, o circuito do bio-reactor já se encontrava fechado, pelo que foi realizado um teste preliminar à sua estanquicidade. Com a bomba peristáltica em funcionamento, a tensão de alimentação da bomba foi aumentada gradualmente, desde 0 V até 7 V, tendo-se constatado que não ocorreu vazamento em nenhuma parte do sistema.

Após os testes realizados na câmara de fluxo laminar o bio-reactor foi transferido para a incubadora. Foi necessário desfazer-se as ligações de tubos de silicone estabelecidas entre o interior do bio-reactor e a tampa da incubadora. Assim sendo, no transporte do bio-reactor entre a câmara de fluxo laminar e a incubadora foram inseridas tampas na extremidade livre dos tubos de silicone que estavam anteriormente ligados à tampa da incubadora. Deste modo, o contacto dos tubos com o ar exterior não-estéril foi minimizado.

Já com o bio-reactor instalado na incubadora, procedeu-se a um segundo teste de estanquicidade. O sistema permaneceu em funcionamento com água ultra-pura em circulação durante 18 horas. Após este período de tempo confirmou-se que não ocorreu vazamento de fluido em nenhuma parte do circuito. No entanto, verificou-se que ocorreu condensação junto aos tubos de silicone, o que significava que o meio de cultura se encontrava a uma temperatura mais baixa do que a temperatura registada no interior da incubadora (37 °C). Para se solucionar este problema resolveu-se encurtar o comprimento dos tubos que transportavam o meio de cultura no exterior da incubadora (de e para a bomba peristáltica), de 80 cm para 40 cm. Foi também colocado um material isolador térmico ao redor desses tubos, o que permitiu reduzir as perdas de calor do meio de cultura exposto à temperatura ambiente no exterior da incubadora.

Os resultados dos vários testes efectuados tanto ao sistema de monitorização da pressão como da estanquicidade de todo o sistema foram bastante positivos, pelo que ficaram reunidas as condições para ensaiar o bio-reactor com uma cultura de células endoteliais numa membrana tubular.



## 5. Cultura celular no bio-reactor

A disponibilidade dum bio-reactor permitiu que se passasse a analisar algumas técnicas de construção de membranas tubulares. Para se poder efectuar ensaios, preliminares, no bio-reactor, optou-se por construir membranas tubulares a partir de matrizes de nano e microfibras, planas, que foram depois enroladas com o diâmetro pretendido.

### 5.1. Produção de matrizes

O procedimento seguido na produção de cada matriz começou pela preparação de uma solução com uma fracção mássica de 10 % de policaprolactona (PCL) e 90 % de clorofórmio (CLF). Na hote, e utilizando-se uma balança de precisão da *RADWAG* (Modelo: *WPS 510/C/2*) adicionou-se 2 g de PCL e 18 g de clorofórmio a um frasco que foi colocado num agitador magnético durante cerca de 4 h, de modo a obter-se uma solução homogénea. Após esse período transferiu-se 8 mL de solução para uma seringa de 10 mL de capacidade.

A técnica utilizada para a produção das matrizes foi a electrofiação. Este método permite a produção de matrizes de nano e microfibras sob um campo electrostático criado por uma alta tensão. O equipamento usado é constituído por uma fonte de alta tensão (ver Figura 5.1 – (1)), uma bomba de seringa (*New Era, Pump Systems Inc.*; ver Figura 5.1 – (2)) e um colector plano rotativo (ver Figura 5.1 – (3)), onde as fibras se depositam sobre uma folha de alumínio. Os parâmetros de electrofiação usados encontram-se na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 Parâmetros de electrofiação das membranas usadas nos testes.

Parâmetros de electrofiação	Valores utilizados
Tensão aplicada à solução pela fonte de alta tensão	14 kV
Calibre da agulha	22-gauge
Caudal (valor programado na bomba da seringa)	0,8 mL/h
Distância entre a agulha e o colector	25 cm
Velocidade de rotação do colector	3,20 rpm
Tempo de deposição	7 h

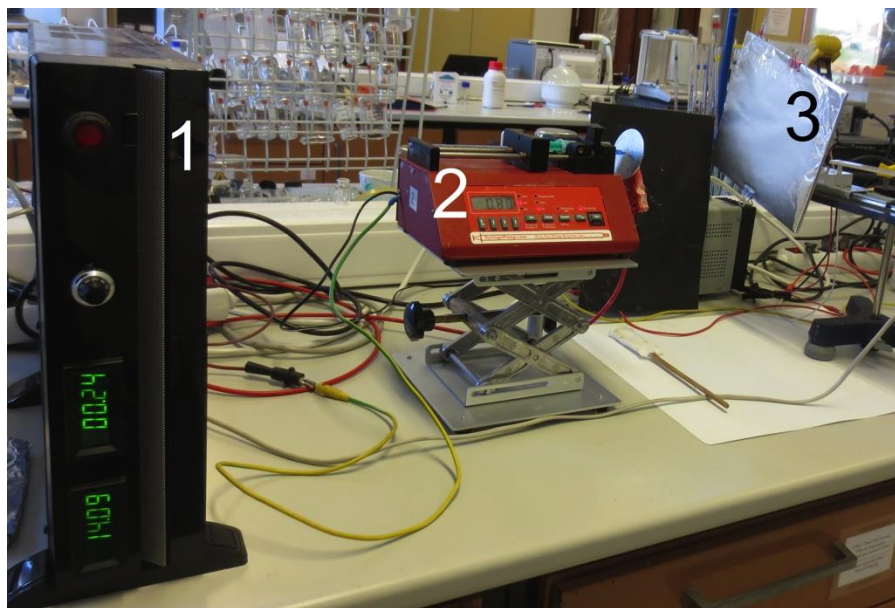


Figura 5.1 Equipamento de electrofiação. 1 – Fonte de alimentação; 2 - Bomba de seringa; 3 – Colector rotativo.

Pretendia-se realizar a sementeira de células numa caixa de Petri de 70 mm de diâmetro interno. Por isso, as matrizes resultantes da electrofiação (ver Figura 5.2 A) ) foram cortadas em quadrados de 49 mm x 49 mm (ver Figura 5.2 B) ). Estas dimensões permitem que, após enrolamento (cerca de 4 voltas), se obtenham membranas tubulares com aproximadamente 49 mm de comprimento e 12,5 mm de perímetro por volta.



A)



B)

Figura 5.2 A) Matriz de PCL resultante de electrofiação usando-se os parâmetros da Tabela 5-1; B) Frações de matrizes cortadas em quadrados de 49 mm x 49 mm.

As matrizes resultantes da electrofiação têm a vantagem de ser maleáveis, adaptando-se a vários tamanhos e formas. Recentemente, a técnica de electrofiação tem vindo a ser aplicada

em Engenharia de Tecidos, pois as matrizes de fibras obtidas assemelham-se à matriz extracelular dos tecidos nativos, que é caracterizada por elevada porosidade, boas propriedades mecânicas e uma vasta rede de poros com vários diâmetros [41], [42]. O controlo dos parâmetros de electrofiação possibilita a produção de membranas tubulares com propriedades semelhantes às dos vasos sanguíneos nativos, em termos de função e configuração [43]. As células conseguem integrar-se facilmente nas microfibras, e são capazes de formar redes celulares tridimensionais [44]. Vários estudos concluíram que as fibras de polímeros (com diâmetro na gama dos nanómetros e dos micrómetros) permitem a adesão, a proliferação e a organização de células *in vitro* [24], [44], [45].

## 5.2. Cultura celular preliminar em matrizes planas

A sementeira em membranas tubulares não é um processo fácil, pelo que se optou por fazer uma cultura preliminar em matrizes planas antes de se enrolar cada uma delas para se obter a forma tubular. Na sementeira foram usadas células endoteliais primárias de coração de rato, cedidas pelo Instituto Gulbenkian de Ciência. As células foram mantidas congeladas a cerca de - 80 °C. O tubo foi retirado do ultracongelador *Cryocell*, e descongelado no equipamento de banho termostático *WNB 10 da Memmert* a 37 °C durante 1 minuto. Depois, juntou-se 1 mL da suspensão celular que estava congelada com 4 mL de meio de cultura num frasco T-25. Quatro horas após o início do descongelamento, foi necessário renovar o meio de cultura, para remoção do DMSO, um composto frequentemente utilizado no meio de congelação de células para evitar a formação de cristais de gelo que podem romper a membrana celular. De seguida, as células foram observadas ao microscópio, tendo-se confirmado a sua viabilidade. Deixou-se as células a proliferar durante os seis dias seguintes, com renovação de meio de cultura de dois em dois dias. As células continuaram a ser observadas ao microscópio invertido com contraste de fase do modelo *Nikon Eclipse Ti-S* todos os dias, para que se avaliasse a sua adesão, viabilidade e taxa de proliferação.

Após as células terem proliferado até preencherem cerca de 30 % da superfície do frasco T-25, decidiu-se dar início à sementeira de células nas matrizes de PCL. As células a semear foram colhidas segundo o protocolo do Apêndice E .

Antes da sementeira, na câmara de fluxo laminar *LabCulture* da *ESCO*, procedeu-se à esterilização de todos os materiais que iriam ser utilizados: duas caixas de Petri (de 70 mm de diâmetro interno), duas máscaras de Teflon e duas matrizes de PCL (ver Figura 5.3). Ambas as caixas de Petri, e as suas respectivas tampas, foram esterilizadas com etanol (a 70 %). Depois, colocou-se uma matriz de PCL e uma máscara de Teflon no interior de cada caixa de Petri. De seguida, cada caixa de Petri foi preenchida com cerca de 20 mL de etanol (a 70%). E, posteriormente, as caixas de Petri, com as máscaras e a matrizes embebidas em etanol no seu interior, foram deixadas, durante uma noite inteira (16 horas), na câmara de fluxo laminar para que o etanol evaporasse.

No dia seguinte foram semeadas cerca de 10 000 células/cm<sup>2</sup> na superfície de cada matriz. A área em que as células foram semeadas ficou confinada à secção da matriz que, após enrolamento, constituiria o lúmen da membrana tubular. O delineamento desta zona foi conseguido através da utilização de uma máscara de Teflon. Deste modo, as células foram

apenas semeadas numa secção de 12 mm x 23 mm, logo, de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>. Assim, no total, foram semeadas cerca de 30 000 células em cada matriz.

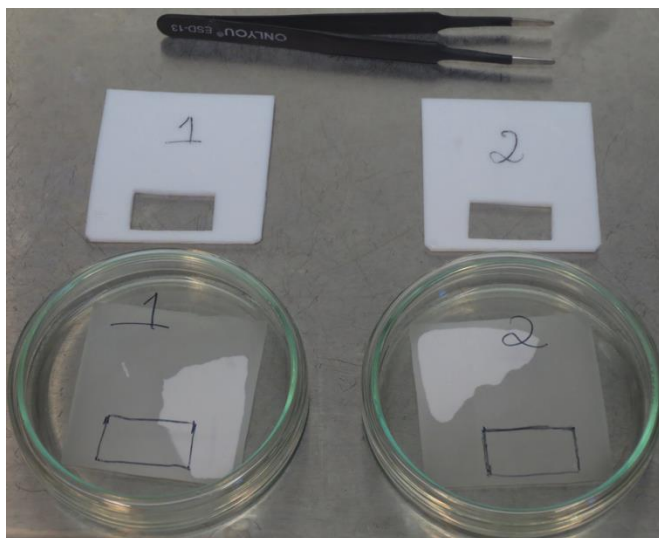


Figura 5.3 Fotografia das máscaras de Teflon (brancas) e das caixas de Petri com as matrizes de PCL no seu interior. Na tampa de cada caixa de Petri está marcada a zona de sementeira de células.

O procedimento foi usado pela primeira vez e, por isso, foi elaborado e cumprido um protocolo que pode ser consultado no Apêndice F .

Terminada a sementeira, as caixas de Petri foram transferidas para a incubadora, onde decorreu a cultura celular, com as matrizes desenroladas, durante cinco dias. O meio de cultura de ambas as caixas de Petri foi renovado a cada dois dias.

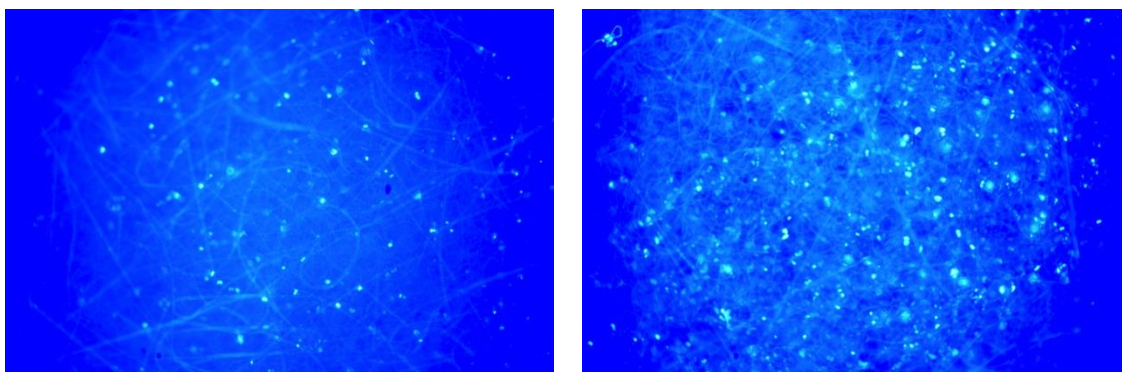
Três dias após a sementeira de células recorreu-se à microscopia de fluorescência para observar as matrizes, o que permitiu obter informação sobre a localização e a distribuição das células.

Neste ensaio foi utilizado o marcador 33342 da *Hoechst*, que é um corante de ácidos nucleicos. A fluorescência do corante é muito sensível à conformação do DNA e ao estado da cromatina nas células. O corante liga-se a todos os ácidos nucleicos, contudo as duplas hélices de DNA ricas em pares A-T melhoram a fluorescência.

A concentração de solução do marcador 33342 *Hoechst* utilizada foi de 1 µg/mL e o período de incubação das células com o corante foi de 20 minutos.

As imagens obtidas no microscópio invertido com contraste de fase *Nikon Eclipse Ti-S* com acessórios para observação de fluorescência (ver Figura 5.4) permitiram localizar as células nas matrizes e revelaram que a sua distribuição não era homogénea. Além disso, era visível um menor número de células semeadas na matriz 1 (posteriormente submetida a cultura estática – ver Figura 5.4 – A) ) em comparação com a matriz 2 (posteriormente submetida a cultura dinâmica no bio-reactor – ver Figura 5.4 – B) ).





A)

B)

Figura 5.4 Fotografias obtidas por microscopia de fluorescência e que mostram as células endoteliais semeadas nas matrizes de PCL três dias após o início da sementeira. A) Matriz 1 – que foi posteriormente submetida a cultura estática; B) Matriz 2 – que foi posteriormente submetida a cultura dinâmica no bio-reactor.

### 5.3. Cultura estática e cultura dinâmica

Cinco dias após a sementeira de células endoteliais nas matrizes de PCL, as matrizes foram enroladas, tendo-se obtido duas membranas tubulares. Foram utilizadas duas varetas de 4 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento que permitiram enrolar as matrizes a partir das suas extremidades. Teve-se o cuidado de as distender durante o processo de enrolamento, para que não colapsassem na zona central. De modo a que a última parte a ser enrolada aderisse ao resto da matriz, foram depositadas algumas gotas de solução com uma fracção mássica de 10 % de PCL e 90 % de CLF nessa zona.

Uma das membranas tubulares destinou-se a ensaiar uma cultura em condições estáticas, ou seja, em que o meio de cultura está estático, numa caixa de Petri, e outra a ser ensaiada em condições dinâmicas em que o meio de cultura passa de forma pulsada pelo interior da membrana, na câmara de cultura do bio-reactor (ver Figura 5.5).



A)

B)

Figura 5.5 Condicionamento das membranas tubulares em condições de: A) Cultura estática numa caixa de Petri; B) Cultura dinâmica no bio-reactor.

A esterilização do bio-reactor foi feita fazendo circular 100 mL de etanol (a 70 %) pelas tubagens e pela câmara de cultura do sistema. Posteriormente fez-se circular 100 mL de *PBS* (*Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato-salino) estéril, para que o etanol que restava nos tubos fosse diluído.

A membrana tubular foi então suturada aos ligadores internos da câmara de cultura no bio-reactor de acordo com o protocolo do Apêndice G . Por último, o bio-reactor foi instalado na incubadora. A instalação foi efectuada segundo o esquema da Figura 4.1 e a imagem da Figura 5.6.



Figura 5.6 Montagem do bio-reactor na incubadora com a membrana tubular instalada na câmara de cultura.

As culturas desenvolveram-se durante dez dias. O meio de cultura da caixa de Petri foi renovado ao quinto dia, enquanto que o meio de cultura do bio-reactor se manteve em circulação. Isto porque o volume de meio de cultura utilizado no bio-reactor (125 mL) era suficiente para satisfazer as necessidades da cultura celular durante todo o período de incubação, sendo o dobro do volume de capacidade da caixa de Petri. Assim, a ocorrência de alguma degradação em certos constituintes do meio de cultura, como o soro fetal bovino (SFB), não é um factor crítico devido ao grande volume de meio de cultura disponível. Além disso, foi utilizado um meio de cultura composto por uma forma estável de L-glutamina, a L-alanil-L-glutamina, o que permitiu prevenir a degradação e a acumulação de amónia.

O antibiótico, constituinte do meio de cultura, sofre alguma degradação passados cerca de cinco dias. No entanto, visto que controla os microrganismos eventualmente presentes nos primeiros dias de incubação e que o sistema permanece fechado, o risco de contaminação nos dias seguintes é muito reduzido.

A cultura dinâmica foi realizada com uma pressão média de 12 mmHg e uma amplitude (pico-a-pico) de 5 mmHg. A bomba peristáltica foi alimentada com 3 V, a que corresponde um caudal médio de 15 mL/min.

Dois dias após a instalação do bio-reactor na incubadora deixou de se conseguir monitorizar a pressão. A detecção da causa da avaria obrigaria a retirar o bio-reactor de dentro da

incubadora, o que iria perturbar a cultura celular em curso. Optou-se por continuar a experiência até ao fim dos 10 previstos para incubação. Assim, a pressão aplicada às membranas tubulares foi mantida constante a 12 mmHg ao longo de todo o período de incubação.

#### 5.4. Observação e comparação das culturas celulares

Após 10 dias de cultura celular, as membranas tubulares foram retiradas da caixa de Petri e da câmara de cultura do bio-reactor, e preparadas para serem observadas por microscopia de fluorescência.

Ambas as matrizes foram lavadas com PBS ++, enriquecido com cálcio e magnésio, dois iões que auxiliam a fixação das células na matriz extracelular. De seguida, as células foram fixadas às matrizes de PCL com formaldeído, um agente de reticulação em proteínas. O período de incubação com formaldeído foi de 10 minutos.

Cada membrana tubular foi cortada longitudinalmente e a membrana plana que se obteve foi novamente cortada em quatro amostras. De seguida procedeu-se a uma marcação das amostras com DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) a uma concentração de 0,3  $\mu\text{Mol/mL}$ . Este emite fluorescência azul após a sua ligação a regiões A-T do DNA. As amostras da cultura estática foram observadas após cerca de 5 minutos de exposição ao DAPI, enquanto que as da cultura dinâmica foram observadas cerca de 10 minutos depois do início da exposição ao DAPI.

Observou-se o lúmen de cada uma das membranas ao microscópio invertido com contraste de fase *Nikon Eclipse Ti-S* com acessórios para observação de fluorescência. Em ambas, foi detectada a presença de raros núcleos celulares, tendo-se verificado a ocorrência de fluorescência em algumas poeiras, proteínas e fibras. O número de células observado nas membranas tubulares foi muito reduzido em comparação com o número de células presentes nas matrizes antes do enrolamento, dificultando assim a comparação entre os resultados das culturas estática e dinâmica.



## 6. Conclusão

Foi elaborado o projecto e realizada a construção de um bio-reactor com materiais não citotóxicos e resistentes ao processo de esterilização. Os testes de fiabilidade efectuados comprovaram que os componentes do sistema de circulação do meio de cultura suportam, mantendo a sua estanquicidade, longos tempos de permanência na incubadora a uma temperatura de 37 °C e a um grau de humidade de 95 %.

A pressão média na câmara de cultura e o caudal do meio de cultura podem ser monitorizados e controlados por forma a terem valores semelhantes aos que ocorrem nos vasos sanguíneos do corpo humano. Os valores são adquiridos em tempo-real e mostrados em gráficos ao utilizador, que os poderá eventualmente gravar e analisar posteriormente com mais detalhe.

A possibilidade de monitorizar e controlar a pressão no bio-reactor permite definir estratégias para aplicação de estímulos à cultura celular. Com efeito, é possível manter uma pressão e um caudal baixos nos primeiros dias de cultura para que as células, sujeitas à tensão de cisalhamento, não se soltem e ir aumentando os valores à medida que o tempo de cultura progride, aumentando também desta forma a intensidade dos estímulos.

Foi desenvolvida uma técnica para produzir membranas tubulares já com células endoteliais semeadas no lúmen. O bio-reactor manteve-se dez dias a funcionar e a aplicar estímulos mecânicos pulsados à membrana tubular. O resultado da cultura no bio-reactor pôde ser comparado com o resultado duma cultura numa membrana, que decorreu numa caixa de Petri, e que não foi sujeita a estímulos mecânicos. Contudo, verificou-se que tanto numa membrana como na outra não foram observadas células em quantidade suficiente, indiciando assim que, em ambos os casos, não foi viável a manutenção da cultura celular.

Houve vários factores de novidade no desenvolvimento do trabalho, nomeadamente na manipulação das células endoteliais e na sua cultura em membranas tubulares. A escolha das células endoteliais teve em conta o resultado de experiências efectuadas por outros grupos que indicam que estas beneficiam dos estímulos mecânicos, proliferando mais e alinhando-se de acordo com estes. Porém, o facto de mesmo na cultura estática se ter observado um reduzido número de células aderidas às membranas tubulares ao fim de dez dias de incubação leva a

concluir que houve um ou mais factores que condicionaram o resultado. Será necessário fazer ensaios para verificar e quantificar a adesão e a proliferação das células endoteliais às membranas planas de PCL para se definirem referências para a sua cultura em membranas tubulares. Eventualmente, para aferir apenas aspectos funcionais do bio-reactor, poderão ser usadas células Vero, cuja adesão e proliferação a membranas planas de PCL estão já bem caracterizadas. O comportamento das células Vero sujeitas ao processo de produção das membranas tubulares será também uma forma de aferir se o procedimento adoptado é compatível com a manutenção das condições favoráveis à adesão e proliferação celulares.

Uma análise ao sistema de monitorização da pressão, feita após a cultura celular ter terminado, permitiu verificar que ocorreram problemas com as ligações eléctricas das fichas dos cabos dos sensores de pressão ao cabo que conduz os sinais entre o exterior e o interior da incubadora. Na origem do problema pode ter estado a humidade a que os terminais foram sujeitos durante os primeiros dias de incubação. É importante melhorar este aspecto para aumentar a fiabilidade das ligações eléctricas no interior da incubadora. Uma solução poderá passar por usar fichas eléctricas estanques.

No cabo que conduz os sinais eléctricos entre o exterior e o interior da incubadora existem duas fichas. Cada uma tem a função de conduzir a alimentação eléctrica vinda da PCB (*Printed Circuit Board*) até um dos sensores de pressão e de transmitir o sinal de saída do mesmo até à PCB. Esta função dupla associada a cada ficha dificulta a detecção de eventuais falhas nas ligações eléctricas estabelecidas. Isto porque, para que o sensor funcione é necessário que esteja ligado à tensão de alimentação, o que implica estar conectado com a ficha do cabo. No entanto, durante a detecção de problemas nas ligações eléctricas, muitas vezes torna-se útil poder efectuar medições com o cabo desligado da ficha. Por estas razões, futuramente deverá ponderar-se a existência de duas fichas distintas para cada sensor, uma para alimentação e outra para condução do sinal de saída. Para tal, será necessário criar uma PCB com uma disposição de fichas diferente e fazer alterações nos terminais dos cabos.

Durante o transporte do bio-reactor, já esterilizado, entre a câmara de fluxo laminar e o interior da incubadora, há um momento em que é necessário desfazer as ligações dos tubos do bio-reactor à tampa da incubadora. Durante este breve momento não é possível garantir a esterilidade do sistema. No entanto, desde que o operador esteja alerta, é possível minimizar o efeito da abertura tomando algumas precauções e cuidados, como por exemplo, esterilizando os materiais com etanol durante o processo de ligação dos tubos. Uma outra opção poderá passar pelo uso da bomba peristáltica no interior da incubadora. No entanto, o seu funcionamento num ambiente de elevado grau de humidade poderá ficar comprometido ao fim de algum tempo.

O bio-reactor desenvolvido controla a passagem de meio de cultura pelo interior de membranas tubulares gerando estímulos mecânicos semelhantes aos estímulos fisiológicos. Desta forma foram criadas condições para que se possam vir a fazer ensaios de cultura celular em membranas tubulares em que se pode variar o tempo de cultura, a duração e a intensidade dos estímulos e, assim, contribuir para o aprofundamento dos conhecimentos que, espera-se, permitirão um dia construir um substituto de um vaso sanguíneo pronto para ser utilizado por um ser humano.

- [1] "WHO | Cardiovascular diseases (CVDs)." [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. [Accessed: 08-Nov-2013].
- [2] R. Ferreira, R. Neves, V. Rodrigues, P. Nogueira, A. Silva, M. Rosa, M. Alves, D. Afonso, A. Portugal, E. Somsen, J. Martins, L. Serra, A. Oliveira, and N. Oliveira, "Portugal - Doenças Cérebro-cardiovasculares em Números - 2013," 2013.
- [3] "Stroke," 28-May-2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001740/>. [Accessed: 17-Jan-2014].
- [4] "Coronary heart disease," 22-Jun-2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0004449/>. [Accessed: 17-Jan-2014].
- [5] P. Bourne and A. Ortiz, "Design and Testing of a Novel Cell Seeding and Bioreactor System for the In- Vitro Growth of Scaffold-Free Tissue Tubes for Tissue Engineered Blood Vessels," 2010.
- [6] A. T. Reyes, R. Frame, and R. F. Brodman, "Technique for harvesting the radial artery as a coronary artery bypass graft.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 59, no. 1, pp. 118–26, Jan. 1995.
- [7] J. Skelly, A. Lopez, and J. Thompson, "Bioreactor design for vascular tissue engineering," 2009.
- [8] R. M. Nerem and D. Seliktar, "Vascular Tissue Engineering," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, no. 3, pp. 225–43, 2001.
- [9] W. J. Zhang, W. Liu, L. Cui, and Y. Cao, "Tissue engineering of blood vessel.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 945–57, Jul. 2007.
- [10] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T. N. Wight, N. a F. Chronos, A. E. Kyles, C. R. Gregory, G. Hoyt, R. C. Robbins, and T. N. McAllister, "Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization.," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 361–5, Mar. 2006.
- [11] L. Soletti, A. Nieponice, Y. Hong, S.-H. Ye, J. J. Stankus, W. R. Wagner, and D. A. Vorp, "In vivo performance of a phospholipid-coated bioerodable elastomeric graft for small-diameter vascular applications.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 96, no. 2, pp. 436–48, Feb. 2011.
- [12] M. S. Baguneid, A. M. Seifalian, H. J. Salacinski, D. Murray, G. Hamilton, and M. G. Walker, "Tissue engineering of blood vessels.," *Br. J. Surg.*, vol. 93, no. 3, pp. 282–90, Mar. 2006.
- [13] L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, and R. Langer, "Functional arteries grown in vitro.," *Science*, vol. 284, no. 5413, pp. 489–93, Apr. 1999.

- [14] D. Shum-Tim, U. Stock, J. Hrkach, T. Shinoka, J. Lien, M. a Moses, A. Stamp, G. Taylor, a M. Moran, W. Landis, R. Langer, J. P. Vacanti, and J. E. Mayer, "Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 68, no. 6, pp. 2298–305, Dec. 1999.
- [15] V. Mironov and V. Kasyanov, "Emergence of clinical vascular tissue engineering.," *Lancet*, vol. 373, no. 9673, pp. 1402–4, Apr. 2009.
- [16] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5910–7, Oct. 2009.
- [17] A. Mathews, S. Colombus, V. K. Krishnan, and L. K. Krishnan, "Vascular tissue construction on poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) scaffolds by dynamic endothelial cell seeding : effect of pore size," *J Tissue Eng Regen Med*, no. 6, pp. 451–461, Jul. 2012.
- [18] C. E. Ghezzi, P.-A. Risse, B. Marelli, N. Muja, J. E. Barralet, J. G. Martin, and S. N. Nazhat, "An airway smooth muscle cell niche under physiological pulsatile flow culture using a tubular dense collagen construct.," *Biomaterials*, vol. 34, no. 8, pp. 1954–66, Mar. 2013.
- [19] R. Pörtner, S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz, and N. M. Meenen, "Bioreactor design for tissue engineering.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 3, pp. 235–45, Sep. 2005.
- [20] Z. C. Xu, W. J. Zhang, H. Li, L. Cui, L. Cen, G. D. Zhou, W. Liu, and Y. Cao, "Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1464–72, Apr. 2008.
- [21] P. Engbers-Buijtenhuijs, L. Buttafoco, A. a Poot, P. J. Dijkstra, R. a I. de Vos, L. M. T. Sterk, R. H. Geelkerken, I. Vermes, and J. Feijen, "Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2390–7, Apr. 2006.
- [22] C. H. Mun, Y. Jung, S.-H. Kim, H. C. Kim, and S. H. Kim, "Effects of pulsatile bioreactor culture on vascular smooth muscle cells seeded on electrospun poly (lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) scaffold.," *Artif. Organs*, vol. 37, no. 12, pp. E168–78, Dec. 2013.
- [23] X. Wang and S. Sui, "Pulsatile culture of a poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sandwiched cell/hydrogel construct fabricated using a step-by-step mold/extraction method.," *Artif. Organs*, vol. 35, no. 6, pp. 645–55, Jun. 2011.
- [24] S. I. Jeong, S. Y. Kim, S. K. Cho, M. S. Chong, K. S. Kim, H. Kim, S. B. Lee, and Y. M. Lee, "Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1115–22, Mar. 2007.
- [25] C. Arrigoni, A. Chittò, S. Mantero, and A. Remuzzi, "Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, no. 5, pp. 988–97, Aug. 2008.
- [26] J. W. Bjork and R. T. Tranquillo, "Transmural flow bioreactor for vascular tissue engineering.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, no. 6, pp. 1197–206, Dec. 2009.
- [27] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering.," *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 2, pp. 80–6, Mar. 2004.



- [28] M. S. Hahn, M. K. McHale, E. Wang, R. H. Schmedlen, and J. L. West, "Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 35, no. 2, pp. 190–200, Mar. 2007.
- [29] K. Iwasaki, K. Kojima, S. Kodama, A. C. Paz, M. Chambers, M. Umezu, and C. A. Vacanti, "Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor.," *Circulation*, vol. 118, no. 14 Suppl, pp. S52–7, Sep. 2008.
- [30] J. A. Chouinard, S. Gagnon, M. G. Couture, A. Lévesque, and P. Vermette, "Design and validation of a pulsatile perfusion bioreactor for 3D high cell density cultures.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, no. 6, pp. 1215–23, Dec. 2009.
- [31] L. Song, Q. Zhou, P. Duan, P. Guo, D. Li, Y. Xu, S. Li, F. Luo, and Z. Zhang, "Successful Development of Small Diameter Tissue- Engineering Vascular Vessels by Our Novel Integrally Designed Pulsatile Perfusion-Based Bioreactor," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42569, Aug. 2012.
- [32] S. E. Diamantouros, L. G. Hurtado-Aguilar, T. Schmitz-Rode, P. Mela, and S. Jockenhoevel, "Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, no. 9, pp. 1979–89, Sep. 2013.
- [33] F. M. Shaikh, T. P. O'Brien, A. Callanan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace, and T. M. McGloughlin, "New pulsatile hydrostatic pressure bioreactor for vascular tissue-engineered constructs.," *Artif. Organs*, vol. 34, no. 2, pp. 153–8, Feb. 2010.
- [34] R. Sodian, T. Lemke, M. Loebe, S. P. Hoerstrup, E. V Potapov, H. Hausmann, R. Meyer, and R. Hetzer, "New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 401–5, Jan. 2001.
- [35] X. Zhang, X. Wang, V. Keshav, X. Wang, J. T. Johanas, G. G. Leisk, and D. L. Kaplan, "Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 19, pp. 3213–23, Jul. 2009.
- [36] "Sterilizing Plastic Parts and Pieces: World Precision Instruments." [Online]. Available: <http://www.wpiinc.com/blog/2013/04/25/product-information/sterilizing-plastic-parts-and-pieces/>. [Accessed: 18-Feb-2014].
- [37] K. Adams, K. Bishop, E. Casey, T. Gwyther, M. Rolle, A. M. Selection, and O. Design, "Design of a Bioreactor to Cyclically Strain Tissue Engineered Blood Vessel Rings," 2011.
- [38] Air Liquide, "Slides 'Esterilização por óxido de etileno.'" [Online]. Available: [http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.br.airliquide.com%2Ffile%2Fotherelement%2Fpj%2Festerilizacao\\_oxido\\_de\\_etileno47295.pdf&ei=sPIYU8mIFlbnygOAYlCIAw&usg=AFQjCNE\\_XSXu mDzbcas26sAJviZxQFpsDg&bvm=bv.62577051,d.bGQ](http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.br.airliquide.com%2Ffile%2Fotherelement%2Fpj%2Festerilizacao_oxido_de_etileno47295.pdf&ei=sPIYU8mIFlbnygOAYlCIAw&usg=AFQjCNE_XSXu mDzbcas26sAJviZxQFpsDg&bvm=bv.62577051,d.bGQ). [Accessed: 20-Feb-2014].
- [39] Z. H. Syedain, L. A. Meier, J. W. Bjork, A. Lee, and R. T. Tranquillo, "Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring.," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 714–22, Jan. 2011.
- [40] "12V DC Dosing Pump Peristaltic Dosing Head For Aquarium Lab Analytical Water DIY ." [Online]. Available: <http://www.ebay.co.uk/itm/12V-DC-Dosing-Pump-Peristaltic-Dosing-Head-For-Aquarium-Lab-Analytical-Water-DIY-/191125650840>. [Accessed: 28-Nov-2014].

- [41] H. Inoguchi, I. K. Kwon, E. Inoue, K. Takamizawa, Y. Maehara, and T. Matsuda, "Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) small-diameter vascular graft," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1470–8, Mar. 2006.
- [42] J. Venugopal and S. Ramakrishna, "Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 125, no. 3, pp. 147–58, Jun. 2005.
- [43] S. J. Lee, J. J. Yoo, G. J. Lim, A. Atala, and J. Stitzel, "In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 83, no. 4, pp. 999–1008, Dec. 2007.
- [44] J. Zhang, H. Qi, H. Wang, P. Hu, L. Ou, S. Guo, J. Li, Y. Che, Y. Yu, and D. Kong, "Engineering of vascular grafts with genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells on poly (propylene carbonate) graft," *Artif. Organs*, vol. 30, no. 12, pp. 898–905, Dec. 2006.
- [45] C. Grasl, H. Bergmeister, M. Stoiber, H. Schima, and G. Weigel, "Electrospun polyurethane vascular grafts: in vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 93, no. 2, pp. 716–23, May 2010.





## Apêndice A — Parâmetros de funcionamento de vários bio-reactores

Tabela A.1 - Resumo dos principais parâmetros usados em vários bio-reactores. ↗: aumento gradual

Parâmetro	Bio-reactores								
	Iwasaki <i>et al.</i> [1]	Song <i>et al.</i> [2]	Wang <i>et al.</i> [3]	Hahn <i>et al.</i> [4]	Jeong <i>et al.</i> [5]	Engbers-Buijtenhuijs <i>et al.</i> [6]	Syedain <i>et al.</i> [7]	Diamantouros <i>et al.</i> [8]	Chouinard <i>et al.</i> [9]
Frequência (bpm)	70	60	Intervalo de ajuste: 0 - 80	60 (pulsção adulta) e 120 (pulsção fetal)	60	Primeiros 3 dias: ↗ de 30 para 120	30	Valores regulados: 60, 120, 180	140
Caudal (mL/min)	Valores médios regulados: 200, 300, 400, 500, 600 *	600	1.5	120	130	Após os 3 primeiros dias: 9,6	Grupo com caudal constante: 3,33 mL/min  Grupo com caudal pulsátil: 2,5 a 5 mL/min	70	70
Pressão (mmHg)	Valores médios regulados: 20, 40, 60, 80, 100 *	80 - 120**	N/A	80 - 120	25	61 – 124	80 – 120	80 - 120	20 - 40
Diâmetro da matriz (mm)	6	4	Interno: 2 Externo: 2,8	Interno: 3 Externo: 6,4	Interno: 3 Externo: 5	Interno: 3 Externo: 6	3,5	N/A	N/A

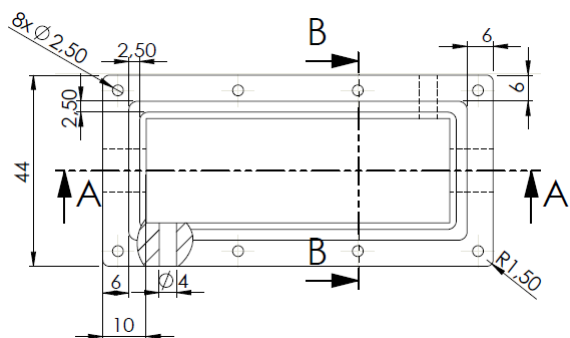
Nota \*: Ao longo de um período de cultura de catorze dias, o fluxo e a pressão foram gradualmente alterados, simulando o estado fetal e o estado adulto de desenvolvimento de um vaso sanguíneo.

Nota\*\*: As pressões 120 mmHg (sistólica) e 80 mmHg (diastólica) foram utilizadas por terem sido aplicadas em estudos anteriores. As artérias de pequeno diâmetro são pressurizadas por uma pressão fisiológica média de cerca de 60 mmHg. O estímulo óptimo a aplicar continua por apurar.

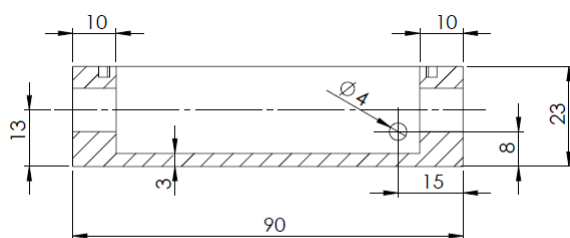
## Bibliografia

- [1] K. Iwasaki, K. Kojima, S. Kodama, A. C. Paz, M. Chambers, M. Umezu, and C. A. Vacanti, "Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor.," *Circulation*, vol. 118, no. 14 Suppl, pp. S52–7, Sep. 2008.
- [2] L. Song, Q. Zhou, P. Duan, P. Guo, D. Li, Y. Xu, S. Li, F. Luo, and Z. Zhang, "Successful Development of Small Diameter Tissue- Engineering Vascular Vessels by Our Novel Integrally Designed Pulsatile Perfusion-Based Bioreactor," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42569, Aug. 2012.
- [3] X. Wang and S. Sui, "Pulsatile culture of a poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sandwiched cell/hydrogel construct fabricated using a step-by-step mold/extraction method.," *Artif. Organs*, vol. 35, no. 6, pp. 645–55, Jun. 2011.
- [4] M. S. Hahn, M. K. McHale, E. Wang, R. H. Schmedlen, and J. L. West, "Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 35, no. 2, pp. 190–200, Mar. 2007.
- [5] S. I. Jeong, S. Y. Kim, S. K. Cho, M. S. Chong, K. S. Kim, H. Kim, S. B. Lee, and Y. M. Lee, "Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1115–22, Mar. 2007.
- [6] P. Engbers-Buijtenhuijs, L. Buttafoco, A. a Poot, P. J. Dijkstra, R. a I. de Vos, L. M. T. Sterk, R. H. Geelkerken, I. Vermes, and J. Feijen, "Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2390–7, Apr. 2006.
- [7] Z. H. Syedain, L. a Meier, J. W. Bjork, A. Lee, and R. T. Tranquillo, "Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring.," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 714–22, Jan. 2011.
- [8] S. E. Diamantouros, L. G. Hurtado-Aguilar, T. Schmitz-Rode, P. Mela, and S. Jockenhoevel, "Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, no. 9, pp. 1979–89, Sep. 2013.
- [9] J. A. Chouinard, S. Gagnon, M. G. Couture, A. Lévesque, and P. Vermette, "Design and validation of a pulsatile perfusion bioreactor for 3D high cell density cultures.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, no. 6, pp. 1215–23, Dec. 2009.

Câmara de cultura

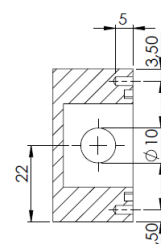


Câmara de cultura: Corte A-A



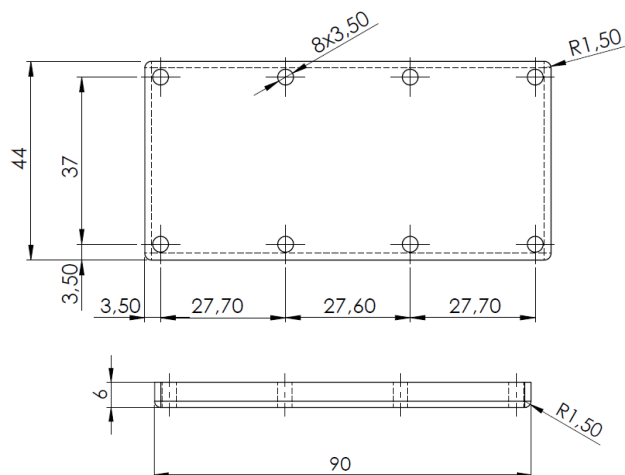
Corte A-A

Câmara de cultura: Corte B-B

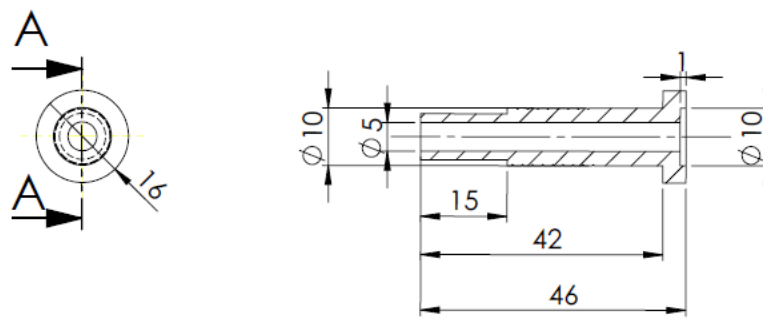


Corte B-B

Tampa da câmara de cultura

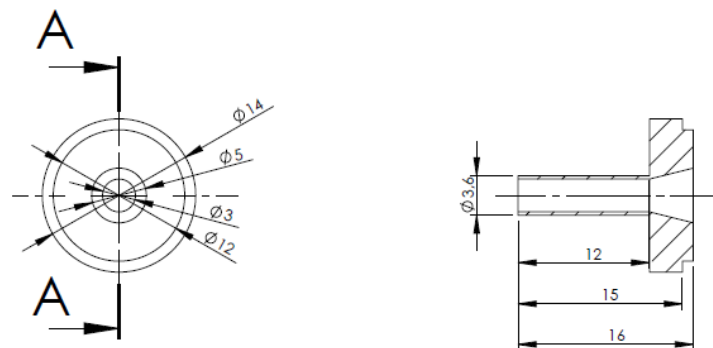


# Ligador externo



CORTE A-A

# Ligador interno



CORTE A-A



## *Apêndice C — Protocolo para limpeza e esterilização do bio-reactor*

---

Em todos os passos que decorrem na sala de cultura, o operador deve usar luvas estéreis, bata e touca, de modo a que se evitem contaminações.

- 1) Limpeza dos componentes do bio-reactor. Todas as peças da câmara de cultura, os tubos de silicone, os conectores de tubos e a tampa do reservatório de meio devem ser submetidos a um banho com ultra-sons, à temperatura de 50 °C, no equipamento *Digital Heater Ultrasonic Cleaner UD100SH-3L*;
- 2) Transferir todos os elementos do bio-reactor para a sala de cultura celular;
- 3) Dispor várias folhas de papel estéril sobre o tampo da câmara de fluxo laminar;
- 4) Antes de serem transferidas para a câmara de fluxo laminar, todas as peças do bio-reactor que entram em contacto com o meio de cultura (e também uma chave de fendas, uma tesoura e uma embalagem de suturas) devem ser pulverizadas ou imersas com etanol (a 70%), procedendo-se à sua esterilização;
- 5) Transferir todos os elementos constituintes do bio-reactor para o interior da câmara de fluxo laminar, que proporciona um ambiente estéril;
- 6) No interior da câmara de fluxo laminar, pulverizar todos os componentes com etanol (a 70 %);
- 7) Deixar o etanol pulverizado nos componentes a evaporar durante uma noite inteira.



## Apêndice D — Protocolo para montagem do bio-reactor

A montagem dos elementos do bio-reactor para incubação de culturas celulares em membranas tubulares deve ser sempre feita em ambiente estéril. Por isso, uma câmara de fluxo laminar proporciona um ambiente adequado para a montagem do sistema. Todos os materiais devem ter sido previamente limpos e esterilizados. O procedimento de montagem é o seguinte:

- 1) Encaixar os ligadores externos e internos de ambos os lados da câmara de cultura, um no outro, através de uma mola de acoplamento;
- 2) Posicionar os sensores de pressão à entrada e à saída da câmara de cultura. Para se estabelecer a conexão entre os sensores de pressão e os ligadores primários externos da câmara de cultura são usados tubos de silicone e acessórios auxiliares (conectores T e conectores rectos);
- 3) Ligar um tubo de silicone com cerca de 80 cm de comprimento ao ligador primário externo, que está posicionado à entrada da câmara de cultura. A outra extremidade do tubo deve ser ligada à tampa da incubadora;
- 4) Ligar o ligador primário externo, que está posicionado à saída da câmara de cultura, ao reservatório de meio de cultura (para permitir o despejo de meio de cultura), através de um tubo de silicone com cerca de 80 cm de comprimento;
- 5) Ligar um tubo de silicone com cerca de 60 cm de comprimento ao conector de saída de meio de cultura do reservatório. A outra extremidade do tubo de silicone deve ser ligada à tampa da incubadora;
- 6) No exterior da câmara de fluxo, a tampa da incubadora deve ser ligada, por um dos tubos à entrada e pelo outro à saída da bomba peristáltica;
- 7) Preencher o reservatório com 200 mL de água ultra-pura;
- 8) Colocar um tubo de silicone de 4 mm de diâmetro interno no interior da câmara de cultura, o qual substitui a membrana tubular;
- 9) Aparafusar a tampa da câmara de cultura, e enroscar a tampa do reservatório de meio de cultura ao frasco.

Na etapa 6) recomenda-se a utilização de tubos de silicone o mais curtos possível, uma vez que fora da incubadora o meio de cultura está exposto à temperatura ambiente.



## *Apêndice E — Protocolo para colheita de células a semear*

---

As células endoteliais foram mantidas em cultura na incubadora (a 37 °C de temperatura, 5 % de concentração de CO<sub>2</sub> e 95 % de humidade) num frasco T-25 desde a altura em que foram descongeladas.

### **Composição do meio de cultura**

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) -  $V_{\text{DMEM}}$
- Soro Fetal Bovino (SFB) – 10 % de  $V_{\text{DMEM}}$
- Antibióticos Penicilina e Estreptomicina – 1 % de  $V_{\text{DMEM}}$

### **Colheita de células**

- 1) Observar as células contidas no frasco T-25 ao microscópio;
- 2) Esterilizar e transferir o frasco T-25 para a câmara de fluxo laminar;
- 3) Descartar o meio de cultura do frasco com uma pipeta de Pasteur;
- 4) Lavar o frasco com 5 mL de PBS, para que as células mortas sejam descartadas;
- 5) Adicionar 500 µL de tripsina (tryPLE), de modo a que as células aderidas se soltem do fundo do frasco;
- 6) Colocar o frasco T-25 com tripsina no interior da incubadora, durante 5 minutos, para que esta actue em condições óptimas (temperatura de 37 °C);
- 7) Transferir o frasco T-25 da incubadora para a câmara de fluxo laminar;
- 8) Neutralizar a acção da tripsina por adição de 5 mL de meio de cultura no frasco;
- 9) Transferir o conteúdo do frasco para um tubo Falcon, pois neste tubo evita-se a adesão celular;
- 10) Transferir 50 µL de suspensão celular contida no tubo Falcon para um tubo Eppendorf;
- 11) Adicionar 50 µL de azul tripano ao tubo Eppendorf;
- 12) Homogeneizar a solução de suspensão celular com azul tripano;
- 13) Transferir 10 µL do conteúdo do tubo Eppendorf para uma micropipeta;

- 14) Transferir o conteúdo da micropipeta para cada uma das quadrículas 3 mm × 3 mm da câmara de Neubauer;
- 15) Contar o número de células vivas na câmara de Neubauer, em ambas as quadrículas, por visualização ao microscópio.
- 16) Obter o número de células por mL na suspensão celular através da seguinte expressão:

$$N_{\text{células em suspensão/mL}} = \frac{\text{Número de células viáveis contadas}}{\text{Número de quadrados com } 1 \text{ mm}^2 \text{ contados}} \times \text{diluição} \times 10\,000$$

- 17) Calcular o número total de células que se pretende semear,  $N_{\text{células a semear}}$ .

$$N_{\text{células a semear}} = N_{\text{células a semear/unidade de área}} \times \text{Área da matriz a semear}$$

- 18) Calcular o volume de suspensão celular requerido, que é dado por:

$$V_{\text{suspensão celular}} = \frac{N_{\text{células a semear}}}{N_{\text{células em suspensão/mL}}} \text{ (mL)}$$

## *Apêndice F — Protocolo para sementeira de células em matrizes planas*

---

Protocolo para a sementeira celular a efectuar com recurso a uma máscara nas membranas planas.

- 1) Contar o número de células presentes na suspensão celular. No âmbito desta dissertação, o resultado foi 18 000 células/mL;
- 2) Colocar uma matriz no interior de cada caixa de Petri;
- 3) Posicionar uma máscara por cima de cada matriz;
- 4) Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de meio de cultura à caixa de Petri (com 70 mm de diâmetro interno), o que é suficiente para que toda a superfície da caixa de Petri fique coberta;
- 5) Pipetar um volume de suspensão celular que contenha o número de células que se pretende semear para a ranhura de aproximadamente 3 cm<sup>3</sup> (em rectângulo 12 mm x 23 mm). Neste caso, utilizou-se 1,5 mL de suspensão celular, pois queria-se semear cerca de 30 000 células na área do lúmen de cada matriz;
- 6) Adicionar 3,5 mL de meio de cultura na caixa de Petri (evitando-se pipetá-lo directamente sobre a ranhura onde foi depositada a suspensão celular, de modo a não perturbar a sementeira de células na matriz).





## *Apêndice G — Preparação do bio-reactor para incubação*

---

Antes da instalação do bio-reactor na incubadora, a membrana tubular deve ser acomodada na câmara de cultura e o sistema deve ser abastecido com meio de cultura. Esta etapa deve decorrer em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar. Os passos de preparação do bio-reactor para incubação são os seguintes:

- 1) Suturar a membrana tubular às extremidades dos ligadores internos da câmara de cultura, usando-se suturas estéreis. Se o comprimento da membrana for mais curto do que o comprimento máximo entre os ligadores internos na câmara de cultura, podem ser utilizadas anilhas de Teflon (esterilizadas) que permitem diminuir essa distância;
- 2) Preencher a câmara de cultura com meio de cultura, usando-se uma pipeta estéril de 10 mL. A membrana tubular deve ficar completamente imersa em meio de cultura;
- 3) Preencher o reservatório com 100 mL de meio de cultura.

A câmara de cultura tem um volume de aproximadamente 25 mL. E o volume de meio de cultura que ocupa os tubos do bio-reactor é de 60 mL. A bomba peristáltica só deve iniciar o seu funcionamento no interior da incubadora, o que permite que na transição entre a câmara de fluxo e a incubadora, os tubos de silicone estejam vazios. Alguns minutos após a bomba começar a funcionar, o reservatório de meio de cultura fica preenchido com cerca de 40 mL de fluido.